



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



METAPROTEÔMICA E BIOQUÍMICA DE SOLOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS E METAIS PESADOS

Eder da Costa dos Santos

Engenheiro Agrônomo (UFSM)

Mestre em Ciência do Solo (UFRGS)

Prof^a Dr^a Lucia Regina Durrant

Orientadora

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do
Grau de Doutor em Ciência de Alimentos

Campinas, SP, Brasil – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Sa59m Santos, Eder da Costa dos
Metaproteômica e bioquímica de solos contaminados por
hidrocarbonetos e metais pesados / Eder da Costa dos Santos. --
Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Lucia Regina Durrant
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade
de Engenharia de Alimentos

1. Metaproteômica. 2. Proteômica ambiental. 3.
Biomarcadores. 4. Biomonitoramento. 5. Solos contaminados. I.
Durrant, Lucia Regina. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Metaproteomic and biochemistry hydrocarbons and heavy metals-contaminated
soils

Palavras-chave em inglês (Keywords): Metaproteomic, Environmental proteomics, Biomarkers,
Biomonitoring, Contaminated soils

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Lucia Regina Durrant

Marta Cristina Teixeira Duarte

Alexandre Nunes Ponezi

Valéria Maia de Oliveira

Marcelo Alexandre Prado

Rose Marry Araújo Gondim Tomaz

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dra. Lucia Regina Durrant
(Orientadora)

Dr. Alexandre Nunes Ponezi

Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

Dr. Marcelo Alexandre Prado

Dra. Valéria Maia de Oliveira

Dra. Rose Marry Araújo Gondim Tomaz

À minha esposa, Deise.

Aos meus pais, Oly e Ester.

Aos meus irmãos, Eduardo, Eneida, Elisandra e Everton.

Ao Professor Marcos Rubens Fries (*in memorian*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e me dar força para continuar a caminhada.

À minha esposa Deise, por seu amor, carinho, cumplicidade e companheirismo.

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

A professora Lucia, pela amizade, confiança, paciência e orientação imprescindível.

Ao professor Juan, pelo exemplo de profissionalismo, conduzindo-me de forma segura, passo a passo a um mundo totalmente novo chamado metaproteômica.

A professora Valéria, por pelos ensinamentos e sugestões.

Aos companheiros de moradia Cd e Roger, pelo companheirismo, paciência, amizade e solidariedade em todos os momentos.

Aos colegas de laboratório, Fábio, Elisângela, Isis, Beto, Cristiano, Maricy, Andréia (Mineira), Emerson (Didi), Tiago, Francine, pelos agradáveis momentos de convívio durante estes anos de pesquisa.

Aos companheiros de laboratório de proteômica ambiental, Daniel Bonilla, Rafael Montes, Ima, Patrícia, Beatriz, Pepe, Amália, Nieves, Juan Jurado, Maricarmem Bárbara, Teresa, pelos ensinamentos científicos e principalmente pela sensibilidade de tornar nossa estada na Espanha mais agradável, pois ao demonstrarem apoio e amizade, conseguiram diminuir a distância e a saudade da família e da Pátria.

A todos os professores do Departamento de Ciências de Alimentos.

Aos membros da banca, pelas sugestões e contribuições de grande valia.

A Capes, pelo auxílio financeiro.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Departamento de Ciências de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

A Eduardo Chicano e Carlos, a los cuales sólo tengo dos palabras a decirles "muchas gracias", mis amigos por todo.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a concretização deste trabalho.

METAPROTEÔMICA E BIOQUÍMICA DE SOLOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS E METAIS PESADOS¹

Autor: Eder da Costa dos Santos

Orientadora: Lucia Regina Durrant

Co-Orientador: Juan López Barea

RESUMO

Hidrocarbonetos, metais pesados e defensivos agrícolas são poluentes que oferecem alto risco à saúde humana e de animais. No entanto, estão constantemente sendo introduzidos no meio ambiente como resultado de atividades petroquímicas, industriais, agrícolas e do próprio estilo de vida moderna, necessitando que processos de remediação sejam empregados para a sua completa eliminação. A biorremediação é um processo mediado por microrganismos que possui grande potencial para recuperação de ambientes contaminados, mas a falta de informação sobre fatores que regulam o crescimento e o metabolismo das comunidades microbianas em ambiente poluído limita sua implementação. Técnicas aplicadas à bioquímica do solo e análises metaproteômicas podem avaliar as atividades microbianas e identificar as alterações fisiológicas decorrentes da exposição a agentes tóxicos. O objetivo do presente estudo foi monitorar parâmetros bioquímicos tais como: respiração, biomassa microbiana, qCO_2 e atividades de enzimas específicas envolvidas nos principais ciclos biogeoquímicos, assim como a identificação dos perfis metaproteômicos de solos impactados. De uma maneira geral, os hidrocarbonetos afetaram todos os parâmetros bioquímicos avaliados, sendo que na presença de metais pesados tais efeitos foram mais acentuados. Para a realização das análises metaproteômicas foi elaborado um protocolo para extração direta de proteínas do solo que permitiu a separação de 1600 spots bem resolvidos em géis 2D-PAGE. Os perfis metaproteômicos revelaram proteínas qualitativamente e quantitativamente expressadas diferentemente em decorrência da presença dos contaminantes. As análises metaproteômicas dos distintos solos expuseram proteínas expressadas em comum, envolvidas no sistema de resposta a estresse ambiental, tais como: chaperonas, fatores de alongação EF-Tu, superóxido dismutases, proteínas de transporte da superfamília ABC, Alquil hidroperóxidos redutases, peptidil prolil cis-isomerases, bem como outras específicas do metabolismo. Estes resultados demonstram que a metaproteômica é uma ferramenta robusta que pode auxiliar no entendimento das comunidades microbianas complexas, revelando alterações dinâmicas da população frente a alterações no ecossistema. Com base na literatura internacional este é o primeiro estudo metaproteômico *“in situ”* de solos contaminados.

¹ Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP. Brasil (188p.) – Março 2008. Trabalho realizado com apoio financeiro da CAPES e Ministerio de Educación y Ciencia de España (REN2002-04366 y CTM2006-08960) y Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta Andalucía (00523), y co-financiado por el FEDER.

METAPROTEOMIC AND BIOCHEMISTRY OF HYDROCARBONS AND HEAVY METALS-CONTAMINATED SOILS¹

Author: Eder da Costa dos Santos

Advisor: Lucia Regina Durrant

Co-Advisor: Juan López Barea

ABSTRACT

Hydrocarbons, heavy metals and agricultural defensives are high risk pollutants to human health. These pollutants are constantly introduced into the environment as a result of petrochemical, industrial, agricultural activities and our modern life style, requiring remediation processes that are used to their complete elimination. Bioremediation is a process carried out by living organisms which has great potential for the recuperation of contaminated environments, but the lack of information about the factors that regulate growth and metabolism of microbial communities in polluted environments limits its implementation. Soil biochemistry techniques and metaproteomics analyses can assess the microbial activity and identify the physiological changes resulting from exposure to toxic agents. The objective of this study was to determine biochemical parameters such as: respiration, microbial biomass, qCO_2 and activities of specific enzymes involved in major biogeochemical cycles, as well as the identification of metaproteomics profiles of contaminated soil. In general hydrocarbons affected all the biochemical parameters evaluated, and the presence of heavy metals caused an increase in these parameters. A protocol for direct extraction of soil proteins that allowed the separation of more than 1600 spots settled in 2D-PAGE gels was developed. The metaproteomics profiles revealed, qualitatively and quantitatively, that proteins were expressed differently due to the presence of these contaminants. Metaproteomics analyses of different exposed soils showed proteins expressed in common, involved in the response to environmental stress, such as: chaperones, elongation factors, EF-Tu, superoxide dismutases, ABC transport protein superfamily, alkyl hydroperoxide reductases, peptidyl prolyl cis-isomerases, as well as the other specific of the metabolism. These results show that metaproteomics is a robust tool that can assist in the understanding of complex microbial communities, revealing the dynamic of the population opposed to changes in the ecosystem. Based on the international literature this is the first "in situ" metaproteomic study of contaminated soils.

¹ Doctoral Dissertation in Food Science. Graduate program in Food Science, Food Engineering College, State University of Campinas. Campinas, SP. Brazil. (188p.) – March 2008. Work supported by CAPES and Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (REN2002-04366 and CTM2006-08960) and Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta Andalucía (00523), and co-supported by FEDER.

ÍNDICE GERAL

Resumo	vi
Abstract	vii
1. Introdução Geral.....	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Hidrocarbonetos do Petróleo	3
2.1.1 Definições e características	3
2.1.2 Problemática.....	4
2.1.3 Legislação dos Hidrocarbonetos de petróleo	5
2.2. Biorremediação dos Hidrocarbonetos	6
2.2.1 Definições e estratégias.....	6
2.2.2 Metabolismo de hidrocarbonetos	7
2.2.3 Fatores que afetam a biodegradação no solo	8
2.2.3.1 Metais Pesados	9
2.2.4 Biorremediação passiva e avaliação do processo.....	10
2.2.5 Potencial biológico para remediação de sítios contaminados.....	11
2.3. Biomonitoramento da Biorremediação	12
2.3.1 Atividades biológicas do solo como bioindicadores	12
2.3.2 Respiração microbiana	13
2.3.3 Biomassa microbiana	13
2.3.4 Quociente metabólico (qCO ₂)	14
2.3.5 Atividades Enzimáticas	14
2.3.5.1 Desidrogenase	15
2.3.5.2 β –glucosidase.....	16
2.3.5.3 Fosfatase ácida	16
2.3.5.4 Lipase	17
2.3.5.5 Arilsulfatase	17
2.4. Metaproteômica de Solos Contaminados	18
2.4.1 Metaproteômica	18
2.4.2 Metaproteômica como ferramenta pós-metagenômica.....	19
2.5. Bibliografia	22
3. Capítulo 1	
Resumo	29
3.1 Introdução	30
3.2 Material e Métodos	32
3.2.1 Seleção da amostra de solo	32
3.2.2 Montagens dos microcosmos	33
3.2.3 Respiração microbiana (Liberação de CO ₂).....	34

3.2.4 Biomassa microbiana e coeficiente metabólica (qCO ₂)	35
3.2.5 Atividades enzimáticas	36
3.2.5.1 Desidrogenase	36
3.2.5.2 Lipase	37
3.2.5.3 β –Glucosidase	38
3.2.5.4 Fosfatase ácida	39
3.2.5.5 Arilsulfatase	40
3.2.6 Contagem da microbiota heterotrófica	41
3.2.7 Contagem da microbiota degradadora.....	41
3.2.8 Determinação de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH)	41
3.2.9 Extração de DNA	42
3.2.10 PCR-DGGE	42
3.2.11 Análise estatística	43
3.3 Resultados e Discussão	44
3.3.1 Seleção das amostras de solo	44
3.3.2 Respiração Microbiana	45
3.3.3 Biomassa Microbiana e coeficiente metabólico (qCO ₂)	47
3.3.4 Atividade Desidrogenase	50
3.3.5 Atividade Lipase	52
3.3.6 Atividade β -glucosidase	55
3.3.7 Atividade fosfatase ácida	56
3.3.8 Atividade arilsulfatase	58
3.3.9 Contagem de bactérias heterotróficas e degradadoras	60
3.3.10 Quantificação da degradação	63
3.3.11 Alterações na diversidade bacteriana (DGGE)	65
3.4 Conclusões	70
3.5 Bibliografia	71
 4. Capítulo 2	
Resumo	76
4.1 Introdução	77
4.2 Material e Métodos	79
4.2.1 Coleta da amostra de solo	79
4.2.2 Análises físico-químicas do solo.....	80
4.2.3 Montagem do experimento in vitro	80
4.2.4 Contagem microbiana.....	81
4.2.5 Extração das proteínas in vitro	81
4.2.6 Quantificação das proteínas e armazenamento	81
4.2.7 Concentração do extrato protéico.....	81
4.2.8 Limpeza do extrato protéico.....	82
4.2.9 Análises proteômicas	82
4.2.10 Primeira dimensão (Isoelectric focusing –IEF)	82
4.2.11 Segunda dimensão (SDS-PAGE)	82
4.2.12 Revelações dos géis	83

4.2.13 Digitalização das imagens	83
4.2.14 Armazenamento dos géis escaneados.....	83
4.2.15 Análise das imagens.....	83
4.2.16 Excisão dos spots	84
4.2.17 Digestão e preparo dos spots para espectrometria de massas	84
4.2.18 Espectrometria de massas	85
4.2.19 Identificação das proteínas (Bioinformática).....	86
4.3 Resultados e Discussão	87
4.3.1 Amostra do solo.....	87
4.3.2 Contagem microbiana.....	88
4.3.3 Análise da expressão das proteínas.....	89
4.3.3.1 Análise qualitativa e quantitativa da exposição a cromo	90
4.3.3.2 Análise qualitativa e quantitativa da exposição a fenol.....	91
4.3.3.3 Análise qualitativa e quantitativa da exposição a fenol+cromo	92
4.3.4 Escolha e identificação das proteínas.....	92
4.3.5 Classificação funcional das proteínas identificadas	104
4.4 Conclusões	112
4.5 Bibliografia.....	113
5. Capítulo 3	
Resumo	116
5.1 Introdução	117
5.2 Material e Métodos	120
5.2.1 Coleta das amostras de solo	120
5.2.2 Processamento do solo no laboratório.....	124
5.2.3 Análises físico-químicas do solo.....	124
5.2.4 Análises de contaminantes	124
5.2.5 Extração direta das proteínas do solo	124
5.2.6 Concentração do extrato protéico.....	125
5.2.7 Limpeza do extrato protéico.....	125
5.2.8 Quantificação das proteínas e armazenamento.....	125
5.2.9 Análises proteômicas	125
5.2.10 Primeira dimensão (Isoelectric focusing –IEF)	126
5.2.11 Segunda dimensão (SDS-PAGE)	126
5.2.12 Revelações dos géis	127
5.2.13 Digitalização das imagens	127
5.2.14 Armazenamento dos géis escaneados.....	127
5.2.15 Análise das imagens.....	127
5.2.16 Excisão dos spots	127
5.2.17 Digestão e preparo dos spots para espectrometria de massas	127
5.2.18 Espectrometria de massas	128
5.2.19 Identificação das proteínas (Bioinformática).....	128
5.3 Resultados e Discussão	129
5.3.1 Caracterização físico-química das amostras de solo.....	129

5.3.2 Análises de contaminantes	131
5.3.3 Extração direta das proteínas do solo	132
5.3.4 Análise de imagens	142
5.3.5 Identificação das proteínas por espectrometria de massas	144
5.4 Conclusões	160
5.5 Bibliografia	161
5.6 Apêndices	167
6. Conclusões Finais	188

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Microcosmos utilizados no experimento de solos contaminados.....	34
Figura 2. Produção acumulada de C-CO ₂ de amostras de solo contaminadas com hidrocarbonetos, na ausência e presença de metais pesados. Os valores são médias de três repetições. Todos os desvios padrões foram menores que os símbolos da legenda do gráfico.	45
Figura 3. Variações da biomassa microbiana ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo seco) durante 90 dias de experimento.	48
Figura 4. Coeficiente metabólico de amostras de solo submetidas a diferentes tratamentos com hidrocarbonetos de petróleo e metais pesados	49
Figura 5. Atividades desidrogenase ($\mu\text{g TPF g}^{-1} 24^{-1}$) de solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados.	51
Figura 6. Atividade da lipase em distintos solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados. Os dados são as médias das amostras em triplicatas e a barra representa o desvio padrão.....	53
Figura 7. Atividade da β -glucosidase em distintos solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados. Os dados são as médias das amostras em triplicatas e a barra representa o desvio padrão	55
Figura 8. Atividade da fosfatase ácida em distintos solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados. Os dados são as médias das amostras em triplicatas e a barra representa o desvio padrão	57
Figura 9. Atividade da arilsulfatase em distintos solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados. Os dados são as médias das amostras em triplicatas e a barra representa o desvio padrão	58
Figura 10. Contagem da população heterotrófica (cultivável) em distintos solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados. Os dados são as médias das amostras em triplicatas e a barra representa o desvio padrão.....	60
Figura 11. Contagem da população degradadora (cultivável) em distintos solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados. Os dados são as médias das amostras em triplicatas e a barra representa o desvio padrão.....	62
Figura 12. Valores absolutos de degradação dos hidrocarbonetos de petróleo no solo. Tratamentos com numeração ímpar tiveram contaminação inicial de TPH de 2.000 mg	

kg⁻¹ e numeração por de 10.000 mg kg⁻¹. As barras representam o erro padrão (p<0,05)
.....64

Figura 13. Porcentual de degradação dos hidrocarbonetos no solo.....64

Figura 14. Análise de agrupamentos de perfis de DGGE de solos contaminados, após 90 dias de experimento. O “bootstrap” representa a similaridade entre os perfis. Análise realizada com o software GelCompare67

Capítulo 2

Figura 1. Vista geral do estuário Domingo Rubio e imagem do local da coleta, dentro do campus da Universidade de Huelva.....79

Figura 2. Fluxograma do experimento in vitro..80

Figura 3. Braço robô utilizado para excisão dos spots selecionados.....84

Figura 4. Braço robô utilizado para digestão e preparo das amostras para espectrometria de massas.....85

Figura 5. Detalhe dos spots selecionados no tratamento de exposição a cromo. As setas indicam o local de cada spot selecionado no gel 2D-PAGE.95

Figura 6. Detalhes dos spots selecionados no tratamento de exposição a cromo. A figura da esquerda representa a região no gel (controle) onde deveria estar o spot, e a figura da direita mostra a região do gel onde o spot foi localizado.....96

Figura 7. Detalhe dos spots selecionados no tratamento de exposição a fenol. As setas indicam o local de cada spot selecionado no gel 2D-PAGE.97

Figura 8. Detalhes dos spots selecionados no tratamento de exposição a fenol. A figura da esquerda representa a região no gel (controle) onde deveria estar o spot, e a figura da direita mostra a região do gel onde o spot foi localizado.....98

Figura 9. Detalhe do spot selecionado no tratamento de exposição a fenol+cromo. A seta indica o local do spot selecionado no gel 2D-PAGE. 99

Figura 10. Detalhe do spot selecionado no tratamento de exposição a fenol+cromo. A seta indica o local do spot selecionado no gel 2D-PAGE 100

Figura 11. Detalhes dos spots selecionados do tratamento de exposição a fenol. A figura da esquerda representa a região no gel (controle) onde deveria estar o spot, e a figura da direita mostra a região do gel onde o spot foi localizado..... 101

Capítulo 3

Figura 1. Estuário Domingo Rubio. A) área do pólo petroquímico; B) Cultivo intenso de morangos; C) Rio Tinto, que recebe rejeitos da atividade de mineração e possui elevada concentração de metais pesados. 120

Figura 2. Local de coleta da amostra S1, contaminada com metais pesados provenientes do Rio Tinto.	121
Figura 3. Local de coleta da amostra S3, contaminada por hidrocarbonetos de petróleo. A amostra foi retirada junto a saída do esgoto, atrás do pólo petroquímico.....	121
Figura 4. Local de coleta da amostra controle, junto ao Campus da Universidade de Huelva (sem histórico de contaminação).	122
Figura 5. Local de coleta da amostra S9, contaminada por defensivos agrícolas utilizados no cultivo de morangos.	122
Figura 6. Detalhes das coletas, nos locais contaminados por hidrocarbonetos (complexo petroquímico) e defensivos agrícolas (intenso cultivo de morangos).	123
Figura 7. 1D-PAGE realizado com amostras extraídas com os protocolos existentes para amostras ambientais. MW= pesos moleculares.	133
Figura 8. 2D-PAGE de extrato protéico do solo utilizando um dos protocolos existente na literatura. Todos os protocolos apresentaram separação e resolução muito semelhante a este gel.....	134
Figura 9. Géis 2D-PAGE após modificações dos protocolos. Os pontos pequenos são impurezas	136
Figuras 10. Primeiro gel obtido com resolução aceitável. As setas indicam a presença de arrastes verticais e os círculos demarcam alguns spots	138
Figura 11. 2D-PAGE de amostras de solo, extraídas com o protocolo desenvolvido. A) solo controle; B) solo contaminado por metais pesados (S1); C) solo contaminado por hidrocarbonetos (S3); solo contaminado por defensivos agrícolas (S9).....	139
Figura 12. 2D-PAGE do solo controle, antes do uso do protocolo de limpeza (esquerda) e depois da limpeza (direita).	140
Figura 13. 2D-PAGE dos solos S1 (géis na parte superior) e S3 (géis na parte inferior), antes do uso do protocolo de limpeza (esquerda) e depois da limpeza (direita).....	141
Figura 14. 2D-PAGE do solo S9, antes do uso do protocolo de limpeza (esquerda) e depois da limpeza (direita).	142
Figura 15. Análise de imagem tri-dimensional realizada para confirmação de spots, com finalidade de evitar falsos positivos. No canto esquerdo da parte superior imagem real do gel, na seqüência imagens 3D geradas pelo software.....	143
Figura 16. Rota metabólica de arginina deiminase.	157

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Composição granulométrica da amostra de solo utilizada para realização dos experimentos.....	32
Tabela 2. Análises químicas da amostra de solo utilizada para realização dos experimentos.....	33
Tabela 3. Tratamentos aplicados aos microcosmos.....	33

Capítulo 2

Tabela 1. Análises físico-químicas do solo utilizado no experimento	87
Tabela 2. Contagem microbiana de exposição a distintos contaminantes	88
Tabela 3. Proteínas expressadas e/ou reprimidas frente à exposição a cromo	90
Tabela 4. Proteínas expressadas e/ou reprimidas frente à exposição a fenol	91
Tabela 5. Proteínas expressadas e/ou reprimidas frente à exposição a fenol+cromo.....	92
Tabela 6. Parâmetros analíticos dos spots selecionados no tratamento de exposição a cromo.....	94
Tabela 7. Parâmetros analíticos dos spots selecionados no tratamento de exposição a fenol.....	94
Tabela 8. Parâmetros analíticos dos spots selecionados no tratamento de exposição a fenol+cromo.	94
Tabela 9. Proteínas identificadas do tratamento de exposição a cromo	102
Tabela 10. Proteínas identificadas do tratamento de exposição a fenol	104
Tabela 11. Proteínas identificadas do tratamento de exposição a fenol+cromo.....	105
Tabela 12. Resumo das proteínas identificadas com suas respectivas funções sintetizadas e o tratamento em que ocorreu a expressão	106

Capítulo 3

Tabela 1. Características físico-químicas das amostras de solos contaminados e controle..	130
Tabela 2. Contaminantes detectados nas amostras de solo.	132
Tabela 3. Metais pesados detectados nas amostras de solo.	132

Tabela 4. Funções das 17 proteínas identificadas do solo controle.....	146
Tabela 5. Funções das 23 proteínas identificadas do solo contaminado por metais pesados (S1).....	147
Tabela 6. Funções das 37 proteínas identificadas do solo contaminado por hidrocarbonetos (S3).	149
Tabela 7. Funções das 31 proteínas identificadas do solo contaminado por defensivos agrícolas (S9).....	153

ÍNDICE DE APÊNDICES

Capítulo 3

Apêndice 1. Análise de similaridade entre repetições do solo controle (géis sobrepostos pelo software). As setas indicam os spots que foram selecionados para espectrometria de massas. Os gráficos de barras demonstram as intensidades dos spots.	167
Apêndice 2. Análise de similaridade entre repetições do solo contaminado com hidrocarbonetos (géis sobrepostos pelo software). As setas indicam os spots que foram selecionados para espectrometria de massas. Os gráficos de barras demonstram as intensidades dos spots.	168
Apêndice 3. Análise de similaridade entre repetições do solo contaminado com metais pesados (géis sobrepostos pelo software). As setas indicam os spots que foram selecionados para espectrometria de massas. Os gráficos de barras demonstram as intensidades dos spots.	169
Apêndice 4. Análise de similaridade entre repetições do solo contaminado com defensivos agrícolas (géis sobrepostos pelo software). As setas indicam os spots que foram selecionados para espectrometria de massas. Os gráficos de barras demonstram as intensidades dos spots.	170
Apêndice 5. Análise de similaridade entre os solos controle e contaminado com metais pesados.....	171
Apêndice 6. Análise de similaridade entre os solos controle e contaminado com hidrocarbonetos.	172
Apêndice 7. Análise de similaridade entre os solos controle e contaminado com defensivos agrícolas.....	173
Apêndice 8. Análise de similaridade entre os solos contaminados com metais pesados e hidrocarbonetos.	174
Apêndice 9. Análise de similaridade entre os solos contaminados com metais pesados e defensivos agrícolas.....	175
Apêndice 10. Análise de similaridade entre os solos contaminados com metais pesados e defensivos agrícolas.....	176
Apêndice 11. Identificação de proteínas extraídas do solo controle.	177
Apêndice 12. Identificação de proteínas extraídas s do solo contaminado por metais pesados (S1).....	178
Apêndice 13. Identificação de proteínas extraídas do solo contaminado por hidrocarbonetos (S3).	180

Apêndice 14. Identificação de proteínas extraídas do solo contaminado por defensivos agrícolas (S9).....	185
---	-----

1. INTRODUÇÃO GERAL

A contaminação ambiental crescente nas últimas décadas e acentuada após a segunda guerra mundial, é o resultado direto de atividades petroquímicas, industriais, agrícolas e do próprio estilo de vida moderno. Estas atividades geram inúmeros resíduos orgânicos, com destaque para hidrocarbonetos do petróleo, que apresentam elevado potencial tóxico e recalcitrante.

Quando dispostos no em matrizes ambientais, alteram de forma massiva e significativa a qualidade de vida dos organismos vivos presentes ao seu entorno. Desta forma, se faz imprescindível a aplicação de tecnologias que efetuem a remediação total ou parcial destes agentes poluidores.

Atualmente dispõem-se de diversas estratégias para remediação de ambientes impactados, podendo empregar a ação química, física ou biológica. A utilização do potencial biológico é a premissa da biorremediação, a qual consiste basicamente na transformação do contaminante a formas menos tóxicas, fundamentada nos processos de degradação microbiana e reações químicas combinadas com processos de engenharia. As transformações decorrentes da ação direta dos microrganismos são, em geral, efetuadas por um complexo enzimático essencial ao metabolismo.

Durante a remediação de ambientes contaminados é necessária a utilização de instrumentos confiáveis para monitoramento das alterações ocorridas na comunidade microbiana que venham a comprometer a eficiência do processo. Existe a evidência que as atividades biológicas do solo são sensíveis ao estresse ambiental, e podem expressar tais alterações. Infelizmente, o conhecimento da estrutura da comunidade microbiana e suas atividades enzimáticas são insuficientes para extrapolar as respostas fisiológicas provocadas pelos contaminantes em função das variáveis ambientais.

Recentemente, com o advento da metagenômica, houve um grande avanço no conhecimento de novos genes, que reflete o grande potencial biocatalítico do solo. Este é avaliado pela presença de genes específicos que codificam determinadas enzimas chaves

no processo de biodegradação. Contudo, a presença de um gene não garante sua expressão, e esta não garante a bioatividade em função de alterações pós-traducionais.

Em contraste, a análise de proteínas de comunidades microbianas (metaproteômica) de um ambiente contaminado representa a expressão máxima do sistema biológico, proporcionando respostas fisiológicas às alterações ambientais ocorridas, além de permitir a inferência filogenética dos microrganismos envolvidos no processo. De posse desse conhecimento é possível fazer previsões, e assim buscar alternativas para maximizar o potencial biodegradativo de ambientes sob biorremediação.

Dentro deste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar alterações nas atividades microbianas e metaproteômicas de solos, decorrentes da contaminação de hidrocarbonetos de petróleo, defensivos agrícolas e metais pesados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HIDROCARBONETOS DO PETRÓLEO

2.1.1 Definições e características

O petróleo é uma palavra que deriva do latim, formada da contração *petrus* (pedra) e *oleum*, (óleo) que significa óleo da pedra. É uma substância oleosa, inflamável, geralmente menos densa que a água, com cheiro característico e coloração que pode variar desde castanho claro até o preto (Tissot & Welte, 1978). É o resultado da degradação anaeróbica da matéria orgânica, durante longos períodos de tempo e sob condições de alta temperatura e pressão, que se converte em gás natural, óleo cru e derivados do petróleo (Müller, 1987).

É constituído por uma mistura extremamente complexa e variável de compostos orgânicos, dos quais a maioria são hidrocarbonetos (50-98% da composição), que variam em peso molecular desde o gás metano (CH_4) até altos pesos moleculares de alquitranos e betume ($>\text{C}_{30}$). Constituem um dos grupos de contaminantes mais importantes, tanto por sua abundância como por sua persistência em distintos compartimentos do ambiente (Casellas *et al.*, 1995).

Os hidrocarbonetos podem apresentar-se em uma ampla variedade de estruturas moleculares, desde cadeias lineares, ramificadas, anéis simples, condensados ou aromáticos. De acordo com as famílias de hidrocarbonetos, o petróleo pode ser agrupado em: parafinas voláteis (alcanos não ramificados e ramificados, até C_{10}), parafinas não voláteis (alcanos lineares e ramificados entre C_{10} - C_{40}), naftenos (cicloalcanos ou cicloparafinas), oleofinas (alcenos) e aromáticos (monoaromáticos e poliaromáticos). Em um grupo à parte estão os compostos das resinas e os asfaltenos (Speight, 1991).

De uma maneira geral, a maior parte dos hidrocarbonetos do petróleo é de alcanos lineares (n-alcanos ou n-parafinas), seguidos por alcanos ramificados, cicloalcanos (ou naftenos) e hidrocarbonetos aromáticos (Fernández *et al.*, 1992).

A composição elementar do óleo cru está condicionada pela predominância dos compostos do tipo hidrocarbonetos, variando de 84-87% de carbono, 11-14% de

hidrogênio, 0-8% de enxofre e de 0-4% de oxigênio, nitrogênio e metais pesados como níquel e vanádio (Howe-Grant, 1996).

2.1.2 Problemática

O petróleo e seus derivados, embora essenciais à vida moderna como principal fonte de energia e matéria-prima para indústria petroquímica, quando disposto no ambiente causa sérios problemas ambientais e oferece um alto risco a saúde do homem e animais (Prince, 1993). Historicamente, têm-se notícias de inúmeros acidentes ocorridos no mundo todo, sendo que o primeiro grande acidente ocorreu na Inglaterra em 1967 (Poffo, 2000). Contudo, o acidente mais conhecido ocorreu em 1989, no Alaska, com o petroleiro Exxon Valdez, que derramou 37.000 ton de petróleo que impactaram 5.000 quilômetros de costa desse estado e foi considerado o maior acidente ecológico dos Estados Unidos e um dos maiores do mundo (CETESB, 2007a). Grande parte dos acidentes ocorre durante o transporte naval, representando 45,5% do total de petróleo lançado ao mar. Não muito distante dos acidentes durante o transporte, vazamentos em terra representam 29% (Sloan, 1999).

No Brasil, os maiores acidentes ocorreram nos anos setenta envolvendo os petroleiros Tamika Maru, em 1974, no canal de São Sebastião, litoral norte de São Paulo, e Tarik Ibn Zyaid, em 1975, na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro. No entanto, o acidente com maior repercussão na mídia, devido a seu impacto socioambiental, ocorreu na Baía de Guanabara em 2000, com o rompimento de um oleoduto que verteu 1,3 ton de petróleo (CETESB, 2007a).

No estado de São Paulo, a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) é o órgão responsável pelo levantamento e monitoramento de áreas contaminadas. O último relatório divulgado em Novembro de 2007, revelou um dado alarmante, do total de 2.272 áreas contaminadas neste estado, 1.745 áreas foram consideradas contaminadas por hidrocarbonetos de petróleo provenientes de postos de combustíveis. Desta forma, o levantamento aponta que os hidrocarbonetos de petróleo são responsáveis pela contaminação de 77% do total das áreas, seguido pelas atividades

industriais que ocupam o segundo lugar com 322 sítios, que representa 14%. Entre os inúmeros grupos de contaminantes, destacaram-se os solventes orgânicos, combustíveis líquidos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), metais e solventes halogenados, ou seja, basicamente hidrocarbonetos de petróleo (CETESB, 2007b).

Todas as áreas enquadradas como contaminadas devem fornecer uma proposta de remediação junto à CETESB. Porém, o levantamento (de distribuição) quanto ao estágio de remediação demonstrou que apenas 94 locais contaminados tiveram o processo concluído, que representa apenas 4% do número total das áreas impactadas, enquanto que 1148 áreas (51%) continuam sem qualquer proposta de remediação. Esta estatística submete à reflexão que existe uma alta demanda por tecnologias de remediação, das quais podemos destacar a biorremediação como uma plausível ferramenta biotecnológica para este emprego (CETESB, 2007b).

2.1.3 Legislação dos Hidrocarbonetos de petróleo

Ao nosso conhecimento, a única legislação existente no Brasil que rege as contaminações do solo e águas subterrâneas, por hidrocarbonetos de petróleo, é a da CETESB para o estado de São Paulo. A legislação trata cada grupo e hidrocarboneto de uma forma específica de acordo com seu grau de toxicidade, estipulando valores de qualidade: a) Valor de referência de qualidade (VRQ): indica um nível de qualidade do solo e da água que estão dentro dos limites adequados para qualquer utilização; b) Valor de prevenção (VP): indica que a concentração de determinada substância está acima da qual podem ocorrer alterações prejudiciais à qualidade do solo e da água; c) Valor de intervenção (VI): indica que a concentração está acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde do homem (CETESB, 2007c)

Desta forma, será classificada como área contaminada sob investigação quando houver constatação da presença de moléculas em concentrações acima dos valores de intervenção, indicando a necessidade de ações de remediação. Para os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), por exemplo, os valores de intervenção (industrial) são de

1,3 e 130 mg kg⁻¹ de solo seco de dibenzo(a,h)antraceno e indeno(1,2,3-c,d) pireno, respectivamente (CETESB, 2007c).

2.2 BIORREMEDIAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

2.2.1 Definições e estratégias

Biorremediação é a utilização de processo ou atividade biológica para transformação de contaminantes em substâncias inertes, que não ofereçam riscos à saúde (Hollinger *et al.*, 1997). Portanto, está fundamentada nos processos de degradação microbiana e reações químicas combinadas com processos de engenharia, criando condições para maximizar as transformações dos contaminantes orgânicos do solo. Embora baseada no princípio da biodegradação, as técnicas de biorremediação envolvem variações de tratamentos, podendo ser “*in situ*” (no local) ou “*ex situ*” (fora do local) (Moreira & Siqueira, 2002). A biorremediação “*in situ*” é uma ótima opção quando as propriedades físico-químicas do solo e do contaminante favorecem a aplicação das técnicas de biorremediação, caso contrário se faz necessário a remoção dos contaminantes para tratamento em local adequado (“*ex situ*”).

Entre as estratégias para biorremediação de hidrocarbonetos no ambiente, destacam-se a biorremediação passiva, a bioestimulação, a bioaugmentação e o “*landfarming*”. Na biorremediação passiva os contaminantes são degradados pelos microrganismos autóctones do solo, ao passo que na bioestimulação a microbiota degradadora recebe aporte de nutrientes orgânicos e/ ou inorgânicos para estimular o seu crescimento. A bioaugmentação consiste da inoculação de microrganismos selecionados (culturas puras ou consórcios) com alta capacidade de degradação e competição, para degradar compostos específicos (Skipper, 1999). O “*landfarming*” é a aplicação de contaminantes na forma líquida ou sólida na camada reativa do solo, onde concentram-se 90% dos microrganismos que utilizam tais compostos como fonte de energia (Bewley, 1996). Neste sistema os resíduos podem ser tratados utilizando as três estratégias anteriormente mencionadas.

O solo, quando utilizado de forma adequada, reúne inúmeras características que o tornam eficaz para tratamentos de resíduos. Sua complexidade física, química e biológica promove o transporte, a retenção e a transformação dos resíduos em substâncias mais simples, tais como: húmus, nutrientes, CO₂ e água, possibilitando desta forma, a reciclagem dos nutrientes e o equilíbrio dos ciclos biogeoquímicos do planeta (Brady & Weil, 2002).

2.2.2 Metabolismo de hidrocarbonetos

Embora os hidrocarbonetos estejam amplamente distribuídos no ambiente, a capacidade de degradação destas moléculas por animais e plantas é muito limitada. Contudo, bactérias, fungos filamentosos e leveduras possuem alta capacidade para degradar e metabolizar estes compostos. Isto acontece pelo fato dos microrganismos possuírem um complexo sistema enzimático que confere a capacidade de usar os hidrocarbonetos como uma fonte de carbono e energia (Jacques, 2005).

O metabolismo dos hidrocarbonetos pode ser dividido em: metabolismo da fração saturada (n-alcanos, alcanos ramificados e cicloalcanos) e metabolismo da fração aromática, em função dos distintos passos, genes e enzimas envolvidas na degradação (Melo & Azevedo, 1997).

O primeiro passo para biodegradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos envolve a oxidação do substrato por oxigenases com a utilização de oxigênio molecular. A biodegradação da fração saturada começa por um ataque monoterminal onde ocorre a formação de um álcool primário, seguido por um aldeído e um ácido monocarboxílico. O ácido carboxílico é degradado via β -oxidação, onde há formação de ácidos graxos com dois carbonos a menos e formação de acetil-coenzima A, com liberação eventual de CO₂ (Melo & Azevedo, 1997).

A fração aromática começa a ser degradada por meio de uma reação de dihidroxilação formando dióis, seguida da clivagem do anel e a formação de intermediários comuns (catecol, protocatecol e gentisato), que posteriormente são degradados em intermediários do ciclo de Krebs (Alexander, 1997).

O fator primordial para que ocorra a biodegradação é a existência de genes apropriados que poderão ser expressados na célula. Em microrganismos estes genes podem estar presentes em moléculas de DNA extracromossomal (em plasmídeos), e são genes indutíveis (Burlage *et al.*, 1989).

2.2.3 Fatores que afetam a biodegradação no solo

A degradação microbiana de hidrocarbonetos no solo depende de uma série de fatores abióticos, que podem comprometer a eficiência do processo. As características estruturais da molécula e os fatores onde a degradação acontece são muitos, interagindo e variando intensamente em tempo e espaço. As principais características químicas do produto em relação à degradação são: tamanho, estrutura química, forma, carga de molécula e a existência de grupos funcionais. Estas determinam o comportamento no solo, a toxicidade, rota metabólica e a absorção pelos microrganismos. Em geral, quanto maior mais condensada e mais ramificada for a molécula, maior a estabilidade química e menor degradação.

Entre os fatores abióticos do solo que afetam a biodegradação destacam-se água, temperatura, pH e metais pesados.

Dentre os fatores citados, o conteúdo de água no solo é considerado vital devido à essencialidade desta substância aos processos biológicos e por sua elevada participação na composição celular, sendo imprescindível para uma alta atividade microbiana (Haider, 1999). O conteúdo de água no solo influencia indiretamente o volume de oxigênio, por ocuparem o mesmo espaço, e assim, determina o tipo de metabolismo (aeróbio e anaeróbio). A degradação de hidrocarbonetos de petróleo freqüentemente requer a ação de enzimas oxigenases, fato que torna o processo biodegradativo dependente do oxigênio molecular (Chaerun *et al.*, 2004)

A temperatura é outro fator muito importante uma vez que influencia os processos de sorção, de solubilidade e de viscosidade, os quais têm grande influência na taxa de reação e na atividade da população do solo em função da biodisponibilidade, onde a máxima degradação ocorre em temperaturas que variam de 24 a 35°C (Rosato, 1997).

Valores de pH extremos são inibitórios para a maior parte dos processos de degradação microbianos. Afetam diretamente a atividade dos microrganismos, através dos efeitos da concentração de H^+ nas células. Cada microrganismo possui uma faixa de pH onde o crescimento é ótimo. Fora desta faixa, a permeabilidade celular é prejudicada e, conseqüentemente, a atividade enzimática celular. Indiretamente, o pH afeta a disponibilidade de elementos essenciais à nutrição microbiana, como o fósforo e os micronutrientes. Além disso, a redução no pH aumenta a disponibilidade de alumínio, do manganês e principalmente de metais pesados (Atlas & Philp, 1995).

Os metais pesados são tóxicos para a maioria dos microrganismos presentes no solo, por serem inibidores enzimáticos e do crescimento microbiano quando em quantidades que excedem a tolerância.

2.2.3.1 Metais pesados

Metais pesados são metais com densidade acima de 5 g cm^{-3} . Dos 90 elementos que ocorrem naturalmente, 21 são não-metais, 16 são considerados metais leves e os 53 restantes são considerados metais pesados (Weast, 1984). A maioria dos metais pesados constitui elementos de transição que apresentam os orbitais incompletamente preenchidos. Estes orbitais conferem uma elevada capacidade redox ativa. Por esta razão, os metais pesados participam como elementos traço em muitas reações bioquímicas. Em altas concentrações, contudo, formam complexos inespecíficos com outros compostos celulares conduzindo a um efeito tóxico. Alguns metais pesados, tais como Hg^{2+} , Cd^{2+} e Ag^+ , formam fortes complexos tóxicos danosos a qualquer função fisiológica. Para que ocorra o efeito tóxico é preciso a entrada dos íons metálicos no interior da célula (Nies, 2003). As células possuem dois tipos de mecanismos para permitir a entrada destes íons metálicos, um inespecífico e outro específico. O primeiro mecanismo ocorre sem gasto de energia por meio de um gradiente quimiosmótico, já o segundo mecanismo usa a hidrólise de ATP como fonte de energia, sendo desta forma ativado em momentos especiais do metabolismo (Nies & Silver, 1995). Assim, na presença de metais pesados ocorre uma tendência de acumulação intracelular devido ao sistema inespecífico estar

constantemente ativado. Quando isso acontece, há um rápido efeito tóxico promovido pelo estresse oxidativo intracelular (Nies, 2003).

Entre os metais pesados com maior potencial tóxico para os microrganismos podemos destacar o cromo, que pode ocorrer na forma de Cr^{+6} (forma mais tóxica) e na forma trivalente (Cr^{+3}), sendo que não há evidências da participação benéfica deste elemento em processos fisiológicos microbianos (Nies, 1999; Cheung & Gu, 2007). À parte da toxicidade, o Cr^{+6} é altamente solúvel, o que o torna móvel e biologicamente disponível no ecossistema (Jan & Young, 1978). Sob condições fisiológicas este elemento reage com redutores intracelulares (ascorbato e glutatona), formando intermediários tais como Cr^{+5} , Cr^{+4} e Cr^{+3} (Xu *et al.*, 2005). No processo, são formadas espécies reativas de oxigênio que podem danificar macromoléculas tais como DNA, proteínas e lipídeos (Cervantes *et al.*, 2001). Para que danos sejam evitados a célula utiliza-se de vários mecanismos para eliminar o cromo do ambiente intracelular. Contudo, qualquer dos mecanismos envolvidos na defesa celular contra este elemento demanda muita energia (Czakó-Vér *et al.*, 1999).

2.2.4 Biorremediação passiva e avaliação do processo

A opção de menor custo de remediação é a detoxificação de sítios contaminados por meio da auto-remediação (biorremediação passiva), a qual depende do conhecimento da taxa natural de biodegradação de poluentes e da identificação dos metabólitos produzidos, para evitar que um tipo de composto tóxico seja substituído por outro. Desta forma, a maneira mais viável para mensurar a taxa de degradação natural é a instalação de poços de monitoramento contínuo em pontos críticos da área contaminada. A alternativa de obter os mesmos dados de microcosmos especiais instalados “*in situ*” é viável para fins de pesquisa (Acton & Barcker, 1992), porém em escala comercial torna-se inviável. Até o presente momento nenhuma das tecnologias emergentes de monitoramento químico foi desenvolvida especificamente para detectar metabólitos. Algumas técnicas como biossensores de luciferase ou testes imunológicos são as

tecnologias de maior potencial para detecção de metabólitos no campo a custos compatíveis com as necessidades do mercado.

Apesar do rápido desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e de imunologia na última década, as análises que visam o potencial microbiológico ainda estão distantes de se tornarem componentes essenciais de estudos comerciais em áreas contaminadas, devido principalmente a limitações pela demora, sensibilidade, precisão e elevado custo (Atlas & Philp, 2005).

Assim, análises microbiológicas são mais comuns quando há necessidade de se averiguar a possibilidade de biorremediação de uma área, sendo que nesses casos, métodos tradicionais de análise ainda predominam largamente sobre tecnologias emergentes (Philp *et al.*, 2005).

2.2.5 Potencial biológico para remediação de sítios contaminados

A avaliação do potencial biológico de áreas contaminadas visa à descrição da capacidade de biodegradação da microbiota natural (Heitzer & Sayler, 1993). Esses dados são tradicionalmente obtidos por técnicas que incluem o enriquecimento de culturas de biodegradadores, sua contagem por plaqueamento em meios seletivos ou por determinação do número mais provável (NM). As análises são demoradas e requerem mão-de-obra especializada. Um monitoramento microbiológico deve fornecer informações sobre os seguintes parâmetros: potencial de biodegradação e potencial biocatalítico do local contaminado.

O potencial de biodegradação é definido pela presença de genes que codificam enzimas capazes de tornar os poluentes menos tóxicos. A informação pode ser obtida diretamente, utilizando-se técnicas de PCR (reação em cadeia de polimerase) ou, em menor grau, por métodos de hibridização “*in situ*” com sondas genéticas fluorescentes específicas para bactérias portadoras desses genes (Sayler *et al.*, 1995).

O potencial biocatalítico diz respeito à quantidade de enzimas capazes de reagir com o poluente. A maneira indireta de avaliá-los consiste em conduzir ensaios de biodegradação usando microcosmos com material obtido do sítio contaminado.

Alternativamente, as enzimas poderiam ser extraídas do solo e sua quantidade analisada por ensaios enzimáticos ou por testes imunológicos específicos. A principal maneira de verificar se uma enzima está sendo produzida no solo pelos microrganismos consiste na extração e análises do mRNA correspondente a esta proteína (Sayler *et al.*, 1995).

As análises prévias destes parâmetros são de suma importância para aplicação de uma estratégia de biorremediação, com maior desempenho e menor custo por área tratada. Entretanto, a falta de métodos rápidos e confiáveis faz com que estas análises sejam desprezadas no momento de escolha das estratégias de biorremediação, baseando-se somente em parâmetros físico-químicos do sítio contaminado e dos compostos contaminantes. Por esta razão, na maioria das vezes, mesmo utilizando-se de técnicas de remediação de alta tecnologia, a resposta em termos de mitigação não condiz com o alto custo empregado e taxas esperadas de biodegradação. Isso ocorre em função da superestimação do potencial biocatalítico do solo, uma vez que as técnicas de remediação estão baseadas na melhoria das condições químicas (pH, potencial Eh, solubilidade, sorção, entre outros), e físicas (umidade, aeração, entre outros) de acordo com as necessidades locais. Contudo, a melhoria das condições microbiológicas são em sua maioria realizadas de forma indireta pela correção dos parâmetros anteriormente mencionados, acarretando em grandes erros do ponto de vista biodegradativo (Jacques, 2005).

Hoje em dia com o surgimento de técnicas rápidas aplicadas à biologia celular, sabe-se que o potencial biocatalítico pode ser estimado com base em atividades enzimáticas e metaproteoma do solo (Singh & Nagaraj, 2006).

2.3 BIOMONITORAMENTO DA BIORREMEDIAÇÃO

2.3.1 Atividades biológicas do solo como bioindicadores

Para avaliar o processo de biorremediação não é suficiente medir a quantidade remanescente de hidrocarbonetos no solo, é necessário observar também os processos microbianos (Joergensen *et al.*, 1995). Avaliações das atividades biológicas do solo, tais como respiração, biomassa, coeficiente metabólico, atividades enzimáticas e contagem

microbiana, podem fornecer informações sobre a presença de microrganismos viáveis bem como a intensidade, tipo e duração dos efeitos dos poluentes sobre a atividade metabólica do solo (van Beelen & Doelman, 1997). Desta maneira, estes parâmetros funcionam perfeitamente como bioindicadores para o monitoramento de áreas sob o efeito de poluentes (Maila & Cloete, 2002).

As principais vantagens dos bioindicadores são: a) podem detectar tanto a toxicidade de compostos originais e como a de metabólitos tóxicos; b) permite avaliação “*in situ*” e “*ex situ*”; c) na maioria dos casos os testes são rápidos; d) métodos simples podem ser usados para avaliar a extensão da poluição.

Entre as desvantagens podemos citar: a) inabilidade de distinguir toxicidade resultante do composto original e metabólitos; b) as respostas dos bioindicadores nem sempre correspondem com a concentração de contaminantes; c) testes diferentes respondem diferentemente para cada agente tóxico (Maila & Cloete, 2005).

2.3.2 Respiração microbiana

A respiração microbiana é um dos parâmetros mais antigos utilizados para quantificar a atividade microbiana. A respiração microbiana representa a liberação de CO₂ ou captura de O₂ como resultado do metabolismo. Ela representa a oxidação da matéria orgânica e compostos orgânicos por microrganismos aeróbios do solo, que, portanto, utilizam O₂ como aceptor final de elétrons (Moreira & Siqueira, 2002).

2.3.3 Biomassa microbiana

A fração orgânica do solo é composta por uma mistura complexa de tecidos vivos e mortos, em seu estado original ou transformadas. Cerca de 98% do carbono orgânico do solo encontra-se na matéria orgânica morta estabilizada, principalmente na forma de húmus.

A biomassa microbiana é a parte viva da matéria orgânica do solo, excluindo-se raízes e animais maiores do que aproximadamente $5 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$. Desta forma, é composta por fungos, bactérias, actinomicetos, leveduras e protozoários (De-Polli & Guerra, 1996).

Esta fração não ultrapassa 1 a 5% do total de materiais orgânicos, sendo que 60 a 80% são microrganismos. Portanto, a maioria da matéria orgânica viva do solo é protoplasma microbiano (Moreira & Siqueira, 2002) que é responsável pela atividade biológica do solo, sendo a principal fonte de enzimas que catalisam as mais diversas transformações biogeoquímicas, que comandam os ciclos dos nutrientes. Portanto, a biomassa microbiana reflete bem as alterações que ocorrem no solo e assim é considerado um indicador sensível das ações antrópicas neste ecossistema (Stenberg, 1999).

2.3.4 Quociente metabólico (qCO_2)

Quociente metabólico corresponde à liberação de CO_2 por unidade de biomassa por certo tempo ($C-CO_2 / C-mic\ h^{-1}$), o que corresponde a um índice de atividade heterotrófica específica da biomassa (Moreira & Siqueira, 2002).

O qCO_2 tem sido utilizado como um indicador de estresse microbiano e interpretado como “eficiência microbiana”, já que se trata de uma medida da energia necessária para manutenção da atividade metabólica em relação à energia necessária para síntese de biomassa (Bardgett & Saggar, 1994).

2.3.5 Atividades Enzimáticas

As enzimas desempenham um papel fundamental no solo e por este motivo suas atividades podem ser utilizadas com sucesso para o monitoramento de vários impactos neste ambiente. A degradação dos hidrocarbonetos a simples moléculas tais como água e CO_2 envolve muitas reações químicas que são catalisadas por enzimas (Top *et al.*, 1999). Estas controlam a liberação de nutrientes para o crescimento dos microrganismos (Gregorich *et al.*, 1994), trocas de gases entre o solo e a atmosfera (Conrad *et al.*, 1983) e propriedades físicas do solo (Martens *et al.* 1992). De acordo com Dick *et al.* (1996), as avaliações de suas atividades podem ser úteis para indicar em que medida um solo está desempenhando seu potencial de ciclagem de nutrientes, nitrificação, oxidação e outros processos vitais à saúde do mesmo. Há ainda a vantagem de que os métodos empregados para medir a atividade das enzimas do solo são geralmente simples, rápidos, acurados e

reproduzíveis (Peterjohn, 1991). Em função disto, diversos trabalhos têm proposto ou demonstrado a utilidade das avaliações de atividades enzimáticas dos solos na determinação de sua “saúde” e qualidade (Dick, 1994; Gregorich *et al.*, 1994; Dick *et al.*, 1996; Garcia *et al.*, 2002).

Como a extração de uma enzima do solo é extremamente difícil, sua presença no mesmo costuma ser caracterizada pela avaliação de sua atividade sob um conjunto de condições previamente estipuladas (pH, temperatura, umidade, concentração de substrato). Desta forma, as atividades enzimáticas do solo costumam medir sua atividade potencial e não sua atividade “*in situ*” (Dick *et al.*, 1996). Conforme Moreira e Siqueira (2002), várias atividades enzimáticas de solo podem ser medidas, sendo que os produtos de suas reações podem ser analisados por diversos métodos dependendo da sua natureza química.

2.3.5.1 Desidrogenase

Oxidações biológicas de compostos orgânicos estão fortemente relacionadas com o processo de desidrogenação, a qual é conduzida por meio de enzimas desidrogenases. As desidrogenases são enzimas do grupo das oxirredutases, que catalisam as transferências de elétrons de uma molécula para outra. Estas enzimas estão localizadas apenas em células vivas intactas (Casida *et al.*, 1964).

A atividade das desidrogenases tem sido utilizada para mensurar, indiretamente, o metabolismo microbiano durante o processo de biodegradação de hidrocarbonetos e as alterações decorrentes do estresse provocado pela presença de metais pesados (Puglisi *et al.*, 2006). Sua atividade é espectrofotometricamente mensurada em função da cor do trifênil formazam, como produto final da captura de hidrogênios liberados durante processos de desidrogenação metabólica pelo cloreto de trifênil formazan. Com base nisto, pode-se inferir como o metabolismo energético está sendo alterado mediante situações de estresse proporcionadas por agentes tóxicos (Frankenberger & Johanson, 1982). O aumento na atividade desta enzima em solos contaminados com hidrocarbonetos é diretamente proporcional aos processos de biodegradação destes

compostos no solo, podendo desta forma ser utilizado como uma ferramenta analítica para mensurar o estado metabólico da microbiota “in situ” (Maila & Cloete, 2005).

2.3.5.2 β -glucosidase

As glucosidases e galactosidases estão largamente distribuídas na natureza e são importantes no ciclo do carbono. Estas enzimas também foram detectadas no solo e a β -glucosidase foi detectada em plantas, animais e microrganismos. A β -glucosidase está mais presente em solos do que as galactosidases. É responsável pela hidrólise de resíduos de β -D-glucose terminal não reduzida, com a liberação de β -D-glucose (Paul & Clark, 1996), a qual é considerada fonte importante de energia para os microrganismos do solo. Este tipo de análise parece ser sensível na discriminação de efeitos de diferentes manejos do solo, em diferentes tipos de solo e em períodos curtos (2 anos) (Dick *et al.*, 1996).

Kuperman & Carreiro (1997) observaram que a atividade da β -glucosidase em solos contaminados por metais pesados foi severamente afetada e apresentou boa correlação entre quantidade de metais e a atividade da enzima. De acordo com Tong (1990) esta enzima está significativamente e positivamente correlacionada com o conteúdo de água e matéria orgânica do solo, mas negativamente com o pH e concentração total de metais pesados, podendo desta forma auxiliar no entendimento de alterações fisiológicas da população microbiana afeta por diversos agentes tóxicos.

2.3.5.3 Fosfatase ácida

As fosfatases são enzimas importantes no ciclo do fósforo, pois o provêm para a absorção dos microrganismos pela liberação de PO_4 de ésteres fosfóricos. As fosfomonoesterases são classificadas como ácidas ou alcalinas de acordo com a atividade ótima em pH ácido ou alcalino, respectivamente. A atividade da fosfatase é fortemente influenciada pelo pH do solo. Adições repetidas de fertilizantes fosfatados suprimem a atividade da fosfatase (Dick, 1994). No entanto, a fosfatase ácida tem sido amplamente estudada e pode prover um índice potencial da mineralização de P orgânico de um solo

(Dick *et al.*, 1996). A fosfatase ácida tem sido utilizada para monitorar a demanda de fósforo orgânico pela microbiota em condições de estresse (Dick *et al.*, 1996).

Deng & Tabatabai (1997) reportaram que diferentes atividades da fosfatase em solos pode ser atribuído as diferenças no pH e conteúdo de carbono orgânico do solo, resultando na variação da população e diversidade microbiana. Bruins *et al.* (2000), relataram que atividade desta enzima é fortemente alterada quando a microbiota do solo é exposta a contaminantes tais como hidrocarbonetos e metais pesados. Sendo que a presença destes últimos agentes tóxicos pode comprometer fortemente a atividade da fosfatase, servindo como uma boa ferramenta para o monitoramento de áreas impactadas (Gong *et al.*, 1997).

2.3.5.4 Lipase

Uma significativa quantidade de lipídeos, tais como pesticidas, emulsões, óleos e lipídeos conjugados entram no solo na forma de triacilgliceróis. A degradação de lipídeos é iniciada por lípases (glicerol ester hidrolases) que atacam as ligações carboxilester presente nos acilgliceróis para liberar ácidos graxos e glicerol. As lipases são produzidas por um grande número de microrganismos (Jaeger *et al.*, 1994) e foi demonstrado em estudos realizados por Margesin *et al.* (2002) que possuem uma ótima correlação com o processo de biodegradação hidrocarbonetos em solos. Este autor demonstrou que a atividade desta enzima é inversamente proporcional ao processo de biodegradação no solo, sendo esta aumentada quando o conteúdo de hidrocarbonetos diminui, possuindo uma sensibilidade de aproximadamente 1 mg g^{-1} de solo seco (Margesin & Schinner, 1999; Maila & Cloete, 2005).

2.3.5.5 Arilsulfatase

As sulfatases são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres orgânicos de sulfato (Tabatabai, 1982). Arilsulfatase tem sido detectado em microrganismos do solo, onde são responsáveis pela mineralização do enxofre orgânico. Desta forma, são de suma

importância para os microrganismos uma vez que a maior parte do enxofre no solo é encontrado na forma de sulfatos orgânicos (Jarvis *et al.*, 1987).

Majer *et al.* (2002) observaram uma significativa correlação negativa da atividade da arilsulfatase com a presença de metais pesados, sendo que resultados semelhantes foram obtidos por Garcia & Hernández (1997). Hinajosa *et al.* (2004), relataram que na presença de pirita (sulfato de ferro) a atividade da arilsulfatase foi reduzida em aproximadamente 40%, quando comparada a atividade de solos sem este contaminante, os quais atribuíram este efeito a drástica diminuição do pH, efeito semelhante ao que acontece em sítios contaminados por metais pesados. Além disso, a atividade da arilsulfatase sofre grandes variações entre solos contaminados e não contaminados e por esta razão pode ser utilizada como uma análise sensível as perturbações deste ambiente (Hinajosa *et al.*, 2004).

2.4 METAPROTEÔMICA DE SOLOS CONTAMINADOS

2.4.1 Metaproteômica

Metaproteômica é a análise proteômica (estudo de todas as proteínas expressadas em um dado momento) de comunidades microbianas complexas no seu ecossistema (Wilmes & Bond, 2006). Com o desenvolvimento da metaproteômica busca-se uma ligação entre a diversidade genética e funcional das comunidades microbianas, permitindo a identificação de novas funções envolvidas em complexas rotas metabólicas (Maron *et al.*, 2007).

Além disso, específicas proteínas identificadas como induzidas ou reprimidas por certa perturbação pode ser considerada como um bioindicador funcional de estresse. Desta forma, pode-se assumir que análises qualitativas de metaproteomas podem indicar sensíveis e específicos bioindicadores de estresse ambiental (Maron *et al.*, 2007).

Apesar de tudo, não existem até o momento na literatura internacional estudos de metaproteomas de solos contaminados que apontem indicativos sobre a origem e funções enzimáticas no ambiente. Ora, a identidade das proteínas, suas funções enzimáticas e distribuição espacial pode ser uma revolucionária linha de pesquisa para o

melhor entendimento das alterações no ecossistema, promovidas pela ação antrópica e, ao mesmo tempo contribuir para desvendar alguns mecanismos biogeoquímicos pouco entendidos até o momento (Schulze *et al.*, 2005). Mesmo já existindo técnicas confiáveis para seqüenciamento do DNA e RNA de amostras ambientais, o estudo proteômico possui algumas evidentes vantagens. As informações obtidas com as análises do DNA e RNA não espelham a fração biológica ativamente funcional. Em contraste, análises metaproteômicas poderão fornecer informações claras sobre a origem filogenética e funcionalidade enzimática das proteínas presentes em um dado ambiente terrestre ou aquático (Kan *et al.*, 2005). O trabalho pioneiro que abordou o assunto é ainda muito incipiente e foi realizado por Schulze *et al.* (2005), onde identificaram um grande número de proteínas presentes na fase aquosa do solo, as quais foram atribuídas a grupos distintos de microrganismos. Este mesmo autor publicou mais dois trabalhos (Schulze, 2004a; Schulze 2004b) acerca da metaproteômica, porém visando o entendimento da ecologia microbiana.

2.4.2 Metaproteômica como ferramenta pós-metagenômica

A metagenômica é a reprodução, o ordenar, a montagem e as anotações diretas do DNA de comunidades microbianas, que tem sido aplicado a diferentes ambientes, tais como: água doce e salgada, solos e ambientes extremos (Beja *et al.*, 2000). Um recente estudo metagenômico do mar do Sargasso (uma região marinha do atlântico norte) revelou uma grande diversidade microbiana complexa existente no oceano, que até o momento era totalmente desconhecido, devido a aplicação de métodos tradicionais de ecologia microbiana. Milhões de genes previamente desconhecidos foram descobertos e anotados (Venter *et al.*, 2004). Os dados genômicos se acumulam, principalmente de culturas puras e de comunidades microbianas de ambientes extremos, que acabam por se tornar críticos para entender a expressão dos genes, e a função das proteínas expressas. Ainda que as seqüências metagenômicas proporcionem uma informação valiosa sobre potenciais funções, a função ecológica exata que a seqüência prediz é quase impossível de se conhecer sem a informação sobre que proteínas são sintetizadas em condições

específicas (Eymann *et al.*, 2002). Para tratar deste anseio, inferências moleculares acerca do pós-genômico tem sido realizadas com base em ferramentas como microarrays e mRNA (Conway & Schoolnik, 2003). Entretanto, como as proteínas/os proteomas são os últimos produtos funcionais de genes/de genomas, os estudos proteômicos das comunidades microbianas (metaproteômica) são necessidades óbvias para o avanço de nossas compreensões a respeito dos mecanismos funcionais das comunidades microbianas complexas na biosfera (Kan *et al.*, 2005).

A metaproteômica pode proporcionar uma medida direta da expressão funcional de genes em termos de presença, abundância relativa e modificações na estrutura das proteínas (Wilmes & Bond, 2004). Os estudos proteômicos e metaproteômicos estão baseados em técnicas de separações de proteínas por meio de géis de eletroforese de duas dimensões (proteômica de primeira geração) e/ou pela separação de peptídeos por cromatografia multidimensional acoplado à espectrômetro de massas (proteômica de segunda geração). A identificação das proteínas pode ser realizada com base na massa (obtida por MALDI-TOF MS) ou pela seqüência dos peptídeos (LC-ESI-MS/MS) (Aebersold & Mann, 2003). Apesar da alta tecnologia disponível para o desenvolvimento das pesquisas metaproteômicas, estas têm sido pouco utilizadas em estudos de comunidades microbianas. Por conseqüência, estudos que se utilizam de eletroforese unidimensional (1D-PAGE) juntamente com análises de atividades enzimáticas, induzidas em resposta ao estresse ambiental, têm sido amplamente utilizados. Estas investigações têm apresentado excelentes resultados, porém, pouca informação concreta sobre as identidades das proteínas induzidas emergiu destes estudos (Ogunseitan, 1997).

Recentemente, métodos proteômicos de segunda geração foram aplicados à investigação de uma comunidade microbiana de um ambiente extremo (biofilme ácido). Neste estudo, pode-se cruzar os resultados proteômicos (metaproteômicos) com metagenômicos e desta forma foi possível fazer uma ligação das funções "*in situ*" com as condições específicas do ambiente (Ram *et al.*, 2005). Entretanto, esta verificação não reflete a realidade de comunidades microbianas complexas tais como solos contaminados, visto que sob condições extremas a biomassa é alta mas a diversidade microbiana é muito

baixa e, por conseqüência, o número de genes expressados (na forma de proteínas) também é pequeno. Assim, até o presente momento (com base na literatura), nenhum estudo de metaproteômica foi aplicado a solos contaminados.

2.5 BIBLIOGRAFIA

ACTON, D. W. & BARKER, J. F. In situ biodegradation potential of aromatic hydrocarbons in anaerobic groundwaters. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 9, p.325-352, 1992.

AEBERSOLD, R. & MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v.422, p.198-205, 2003.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. Ithaca, NY: Academic Press, pp.302. 1997.

ATLAS, R. M. & PHILP, J. **Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-World Environmental Cleanup**. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp.366. 2005.

ATLAS, R. M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v.31, p.178-182, 1995.

BARDGETT, G. D. & SAGGAR, S. Effect of heavy metal contamination on the short-term decomposition of labeled (^{14}C) in a pasture soil. **Soil biology and Biochemistry**, v. 26, p.727-733. 1994.

BEJA, O. *et al.* Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. **Environmental Microbiology**, v.2, p.516–529, 2000.

BEWLEY, R. J. F. **Field implementation of in situ bioremediation: Key physicochemical and biological factors**. In: STOTZKY, G., BOLLAG, J. M. (Ed.) *Soil Biochemistry*. New York: Marcel Dekker, v.9, p. 473-542. 1996.

BRADY, N.C. & WEIL, R.R. **The soils around us**. In: BRADY, N.C.; WEIL, R.R. *The nature and properties of soils*. 13th ed. New Jersey: Prentice Hall, p.1-29. 2002.

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.45, p.198–207, 2000.

BURLAGE, R. S. *et al.* The TOL (pWWO) Catabolic Plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p.1323-1328, 1989.

CASELLAS, M., P. FERNÁNDEZ, J. M. BAYONA Y A. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona (Spain). **Chemosphere** v.30, p. 725-740, 1995.

CASIDA, L. E. Jr. *et al.* Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, v. 98, p.371-376. 1964.

CERVANTES, C. *et al.* Interactions of chromium with microorganisms and plants. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.335–347, 2001.

CETESB. DECISÃO DE DIRETORIA Nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005 - Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf. Acesso em: 23 de out. 2007c

CETESB. Principais acidentes em São Paulo - Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/acidentes/acidentes.asp>. Acesso em: 23 de out. 2007a

CETESB. Relação de áreas contaminadas - Novembro de 2006- Disponível em: CETESB. Valores orientadores para solo e água subterrânea - Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/valores.asp>. Acesso em: 23 de out. 2007b

CHAERUN, S. K.; TAZAKI, K.; ASADA, R. Bioremediation of coastal areas 5 years after Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. **Environmental International**, Elmsford, v.30, p.911-922, 2004.

CHEUNG, K. H. & GU, J. D. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.59, p.8–15, 2007.

CONRAD, R. *et al.* Kinetics and electron transport of soil hydrogenases catalyzing the oxidation of atmospheric hydrogen. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.15, n.2, p.167-176, 1983.

CONWAY, T & SCHOOLNIK, G.K. Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. **Molecular Microbiology**, V.47, p.879–889, 2003.

CZAKO'-VE'R, K. *et al.* Hexavalent chromium uptake by sensitive and tolerant mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. **FEMS Microbiology Letters**, v.178, p.109–115, 1999.

DENG, S. P., & TABATABAI, M. A. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils:III. Phosphatases and arylsulfatase. **Biology and Fertility of Soils**, v.24, p.141–146, 1997.

DE-POLLI, H. & GUERRA, J. G. **Biomassa microbiana: perspectivas para o uso e manejo do solo**. In: ALAVAREZ, V. H., FONTES, L. E. F., FONTES, M. P. F. (Ed.) O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado. Viçosa: UFV, p. 551-564. 1996.

DICK, R. P. *et al.* **Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators.** In: DORAN, J. W., JONES, A. J. (Ed.) *Methods for assessing soil quality.* Madison: Soil Science Society of American, p. 247-272. 1996.

DICK, R.P. **Soil enzyme activities as indicators of soil quality.** In: DORAN, J.W. *et al.* (eds.) *Defining soil quality for a sustainable environment.* Madison: SSSA: ASA, 1994. p.107-124. (SSSA Special Publication, 35).

EYMAN, C. *et al.* *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. **Journal Bacteriology**, v.184, p.2500–2520, 2002.

FERNÁNDEZ, P., GRIFOLL, M., SOLANAS, A. M. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. **Environmental Science and Technology**, v. 26, p.817-829, 1992.

FRANKENBERGER, W.T. & JOHANSON, J.B. Influence of crude oil and refined petroleum products on soil dehydrogenase activity. **Journal of Environmental Quality**, v.11, p.602–607, 1982.

GARCÍA, C. *et al.* Effect of plant cover decline on chemical and microbiological parameters under Mediterranean climate. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.34, n.5, p.635-642, 2002.

GARCÍA, C. & HERNÁNDEZ, T. Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.171-177, 1997.

GONG, P.; LI, P. J.; SUN, T. H. Ecotoxicological effects of Cd, Zn, phenanthrene and MET combined pollution on soil microbe. **China Environmental Science**, v.17, p.58–62, 1997.

GREGORICH, E.G. *et al.* Towards a minimum data set to assess soil organic matter quality in agricultural soils. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v.74, n.4, p.367-385, 1994.

HAIDER, K. **Microbe-soil-organic contaminant interactions.** In: ADRIANO, D.C. *et al.* (Ed.) *Bioremediation of contaminated soils.* Madison: ASA/CSSA/SSSA, p.33-51. 1999.

HEITZER, A. & SAYLER, G.S. Monitoring the efficacy of bioremediation. **TIBTECH**, v.11, p.334-343, 1993.

HINOJOSA, M. B. *et al.* Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p.1559–1568, 2004.

HOLLINGER, C. *et al.* Contaminated environment in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.20, n.4, p.517-523, 1997.

HOWE-GRANT, M. **Petroleum**. Encyclopedia of chemical technology 4th ed. Wiley Interscience Publication. New York. pp. 342-480. 1996.

http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp. Acesso em: 16 de set. 2006

JACQUES, R. J. S. **Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo**. 2005. 188 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

JAEGER, K. E. *et al.* Bacterial lipases. **FEMS Microbiology**, v. 15, p.29-63, 1994.

JAN, T. K. & YOUNG, D. R. Chromium speciation in municipal wastewaters and seawater. **Journal of Water Pollution Control Federation**, v.50, p.2327-2336, 1978.

JARVIS, B. W. *et al.* Arylsulphatase activity in peat exposed to acid precipitation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.107-109, 1987.

JOERGENSEN, R. G. *et al.* Biomass and activity of microorganisms in a fuel-oil contaminated soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, p.1137-1143, 1995.

KAN, J. *et al.* Metaproteomic analysis of Chesapeake bay microbial communities. **Saline Systems**, v. 1, p.7-19, 2005.

KUPERMAN, R.G. & CARRIERO, M.M. Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland system. **Soil Biology & Biochemistry**, v.29, p.179-190, 1997.

MAILA, M. P. & CLOETE, T. E. Germination of *lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 50, p.107-113, 2002.

MAILA, M. P. & CLOETE, T. E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants – Perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 55, p.1-8, 2005.

MAJER, J. B. *et al.* Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. **Mutation Research**, v.515, p.111-124, 2002.

MARGESIN, R. *et al.* A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil. **Biotechnology Letters**, v. 24, p.27-33, 2002.

MARGESIN, R. & SCHINNER, F. Biological decontamination of oil spills in cold environments. **Journal Chemistry Technology and Biotechnology**, v.74, p.1-9, 1999.

MARON, P. A. *et al.* Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology. **Microbiol Ecology**, v. 53, p.486-493, 2007.

MARTENS, D.A. *et al.* Production and persistence of soil enzymes with repeated addition of organic residues. **Soil Science**, Baltimore, v.153, n.1, p.53-61, 1992.

MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, pp.440, 1997.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Ed. UFLA, pp.626. 2002.

MÜLLER, H. Hydrocarbons in the freshwater environment: a literature review. **Archives Hydrobiology Advances Limnology**, v. 24, p.1-69, 1987.

NIES, D. H. & SILVER S. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. **Journal Indust Microbiol**, v.14, p.186-199, 1995.

NIES, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.27, p.313-339, 2003.

NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.51, p.730-750, 1999.

OGUNSEITAN, O.A. Direct extraction of catalytic proteins from natural microbial communities. **Journal Microbiological Methods**, v. 28, p.55-63, 1997.

PAUL, E.A. & CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic Press, pp.340. 1996.

PETERJOHN, W.T. Denitrification: enzyme content and activity in desert soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.23, n.9, p.845-855, 1991.

PHILP, J. C. *et al.* **Monitoring Bioremediation**. In: ATLAS, R. M. & PHILP, J. Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-World Environmental Cleanup. American Society for Microbiology, Washington, DC. p.237-268, 2005.

POFFO, I.R.F. **Vazamentos de óleo no Litoral Norte do Estado de São Paulo: análise histórica (1974 a 1999)**. Dissertação de mestrado. USP/PROCAM- Programa de Pós graduação em Ciências Ambientais. 2000.

PRINCE, R.C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. **Critical Reviews in Microbiology**, v.19, p.217-242, 1993.

PUGLISI, E. *et al.* Development and validation of numerical indexes integrating enzyme activities of soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, 1673–1681, 2006.

RAM, R.J. *et al.* Community proteomics of a natural microbial biofilm. **Science**, v.308, p.1915–1920, 2005.

RODRIGUEZ-VALERA, F. Environmental genomics, the big picture? **FEMS Microbiological Letters**, v.231, p.153-158, 2004.

ROSATO, Y. B. **Biodegradação do petróleo**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microbiologia Ambiental. EMBRAPA, São Paulo. p.307-304, 1997.

SAYLER, G. S. *et al.* Molecular site assessment and process monitoring in biorremediation and natural attenuation. **Applied Biotechnology**, v.54, p.277-290, 1995.

SCHULZE, W. Environmental proteomics – what proteins from soil and surface water can tell us: a perspective. **Biogosciences Discussions**, v.1, p.195-218, 2004a.

SCHULZE, W. Proteins analysis in dissolved organic matter: what free proteins from soil leachate and surface water can tell us – a perspective. **Biogosciences Discussions**, v.1, p.825-853, 2004b.

SCHULZE, W. X. *et al.* A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and soil particles. **Oecologia**, v.142, 335-343, 2005.

SINGH, O.V. & NAGARAJ, N.S. Transcriptomics, proteomics and interactomics: unique approaches to track the insights of bioremediation. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v.4, n.4, p.355-362, 2006.

SKIPPER, H.D. **Bioremediation of contaminated soils**. In : SYLVIA, D. M. *et al.* (Ed.) Principles and applications of soil microbiology. New Jersey: Prentice Hall, 1999. p.469-481.

SLOAN, N. A. **Oil impacts on cold-water marine resources: a review relevant to Parks Canada's evolving marine mandate**. (1999). Disponível em: http://parkscanada.pch.gc.ca/library/DownloadDocuments/DocumentsArchive/occasional_paper11_e.pdf. Acesso em: 16 Abr.2005.

SPEIGHT, J. G. **The chemistry and technology of petroleum**. John Wiley and Sons. New York. 1991.

STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. **Soil and Plant Science**, v. 49, p.1-24. 1999.

TABATABAI, M. A. **Soil enzymes**. In: Methods of soil analysis, Part 2, Chemical and microbiological properties. PAGE, A. L. *et al.* (Eds.) American Society of Agronomy, Madison, WI, p.903-947, 1982.

TISSOT, B.P. & WELTE, D.H. **Petroleum formation and occurrence**. Berlin: Springer-Verlag, p.539, 1978.

TONG, S.T.Y. Road dusts and soils contamination in Cincinnati, Ohio, USA. **Environmental Manage**, 14, p.107-113, 1990.

TOP, E. M. *et al.* Methane oxidation as method to evaluate the removal of 2,4-D from soil by plasmid-mediated bioaugmentation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 28, p.203-213, 1999.

VAN BEELEN, P. V. & DOELMAN, P. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. **Chemosphere**, v. 34, p.455-499, 1997.

VENTER, J. *et al.* Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, v.304, p.66-74, 2004.

WEAST, R. C. **CRC handbook of chemistry and physics**, (Eds.) 64. CRC, Boca Raton, Fla. 1984.

WILMES, P. & BOND, P.L. Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. **TRENDS in Microbiology**, v.14, n.2, p.92-97, 2006.

WILMES, P. & BOND, P.L. The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. **Environmental Microbiology**, v.6, p. 911-920, 2004.

XU, X. R. *et al.* Kinetics of the reduction of chromium (VI) by vitamin C. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.24, p.1310-1314. 2005.

BIOQUÍMICA DE SOLOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS E METAIS PESADOS¹

Santos, E.C.^{2*}; Simões, T.H.N.³; Simioni, K.C.M.³; Oliveira, V.M.³; Durrant, L.R.²

²Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana/FEA/UNICAMP, Campinas, SP.

³Divisão de Recursos Microbianos/CPQBA/UNICAMP, Paulínia, SP.

*ederrs@fea.unicamp.br

RESUMO

Experimentos de microcosmos foram conduzidos com solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e os metais pesados cromo e cobre para determinar os efeitos destes agentes tóxicos sobre as atividades e estrutura da comunidade microbiana. Foram analisadas respiração e biomassa microbiana, qCO_2 , as atividades enzimáticas da desidrogenase, lipase, β -glucosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase, contagem microbiana, quantificação da degradação e perfis de diversidade das comunidades gerados pela técnica de DGGE, ao longo de 90 dias de experimento. Os resultados revelaram que os solos que combinaram hidrocarbonetos e metais pesados, de uma maneira geral, apresentaram efeitos tóxicos mais acentuados. Com base nos resultados as atividades microbianas do solo podem ser utilizadas para complementar as ferramentas existentes de biomonitoramento durante processos de remediação de sítios contaminados.

Palavras chaves: Atividades microbianas; biomonitoramento; solo.

¹ Artigo em preparação para ser submetido à revista **Soil Biology and Biochemistry** (F.I.=2,62)

3.1. INTRODUÇÃO

A poluição do solo por produtos do petróleo é um problema amplamente generalizado, sendo que os hidrocarbonetos são os poluentes mais comumente introduzidos no meio ambiente. Estes apresentam um elevado potencial de risco à saúde para os seres vivos que estão no seu entorno, tornando necessária aplicação de tecnologias que eliminem eficientemente tais agentes tóxicos.

Entre as tecnologias disponíveis a biorremediação é plausível de uso, estando fundamentada na capacidade intrínseca de alguns microrganismos metabolizarem os poluentes, mineralizando-os completamente até CO_2 ou reduzindo o potencial tóxico inicial. O processo de biodegradação dos hidrocarbonetos usualmente requer a cooperação de mais de uma espécie microbiana. Microrganismos individuais podem metabolizar apenas uma limitada fração dos compostos orgânicos presentes no petróleo. No entanto, comunidades microbianas complexas como as presentes no solo dispõem de uma grande variedade de complexos enzimáticos que possibilita a completa mineralização.

A intensidade da biodegradação dos hidrocarbonetos no solo é influenciada por vários fatores ambientais, tais como a disponibilidade de nutrientes, oxigênio, pH, temperatura, conteúdo de água, qualidade e quantidade de contaminantes biodisponíveis, propriedades do solo e presença de metais pesados. Este último fator contribui sinergicamente ao efeito tóxico de compostos orgânicos, tornando mais lenta a taxa de degradação e despendendo maior energia metabólica durante o processo.

Em muitas áreas contaminadas as condições para o processo de biodegradação podem estar distintamente limitadas. As técnicas de biorremediação buscam a otimização do processo pela melhoria das condições através da aeração, adição de nutrientes e controle do pH e temperatura. Para acessar os resultados da destoxificação biológica não é suficiente apenas medir o conteúdo de poluentes remanescentes, é necessário observar também o processo microbiano, porque nem todos os contaminantes serão completamente mineralizados no curso da biodegradação.

Investigações biológicas do solo (respiração, biomassa, qCO_2 , atividades enzimáticas) podem dar informações sobre a presença de microrganismos viáveis bem como a intensidade e a duração dos efeitos dos poluentes sobre a atividade metabólica do solo, e desta forma avaliar o impacto da poluição sobre a qualidade do solo.

O objetivo do presente estudo foi monitorar parâmetros bioquímicos e a alteração final na diversidade bacteriana de um solo sem histórico de contaminação submetido a distintas dosagens de hidrocarbonetos de petróleo, na presença e ausência dos metais pesados cromo e cobre.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Seleção da amostra de solo

O solo para desenvolvimento dos experimentos foi coletado em uma área localizada no Campo Experimental da Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, sob as seguintes coordenadas geográficas: latitude 22°48'57" sul, longitude 47°03'33" oeste e altitude média de 640 m.

Este solo está classificado como Latossolo Roxo distrófico textura argilosa, pertencente à Unidade Barão Geraldo, o que corresponde, na classificação norte americana, a um solo Typic Haplorthox, localizado no terço médio de uma encosta com 9% de declive, orientação norte-sul e exposição oeste.

Conforme a classificação de Köppen, a região de estudo é definida como uma transição entre os tipos Cwa e Cfa, o que indica um clima tropical de altitude com inverno seco e verão úmido. As temperaturas do mês mais quente e do mais frio são, respectivamente, superiores a 22°C (fevereiro) e menores que 18°C (junho). A precipitação média anual é de 1.382 mm, com o período chuvoso estando entre outubro a março (1.048 mm), o que representa 75% do total de chuva anual. Já o período mais seco ocorre de junho a Setembro, quando há uma deficiência hídrica no solo (7 mm).

Logo após a coleta foram realizadas análises granulométricas e químicas da amostra de solo, das quais os resultados podem ser vistos nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Composição granulométrica da amostra de solo utilizada para realização dos experimentos.

Horizonte		Composição granulométrica (%)		
Símbolo	Profundidade (cm)	Argila	Silte	Areia total
Ap	0-20	55	10	35

Tabela 2. Análises químicas da amostra de solo utilizada para realização dos experimentos.

pH CaCl ₂	P (mg dm ⁻³)	Bases trocáveis (mmol _c dm ⁻³)		
		Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺
5.3	3,9	52	19	9.2
Acidez potencial H+Al (mg dm ⁻³)	S (mg dm ⁻³)	CTC (mg dm ⁻³)	V (%)	M.O. (%)
38	2,8	118	68	4.4

S=soma de bases; CTC= capacidade de troca de cátions; V=saturação de bases; M.O= matéria orgânica.

3.2.2 Montagens dos microcosmos

Após a correção da umidade do solo para 55% da capacidade de campo (CC) e homogeneização, amostras de 400 g foram adicionadas em frascos herméticos (Figura 1) com capacidade de 1,5 L. Posteriormente foram aplicados os tratamentos conforme Tabela 3.

Tabela 3. Tratamentos aplicados aos microcosmos.

Tratamento	Óleo cru (TPH) (mg kg ⁻¹ de solo)	Cromo (K ₂ Cr ₂ O ₇) (mg kg ⁻¹ de solo)	Cobre (CuCl ₂) (mg kg ⁻¹ de solo)
C	0	0	0
T1	2000	0	0
T2	10000	0	0
T3	2000	300*	0
T4	10000	300	0
T5	2000	300	300*
T6	10000	300	300

*Acima dos valores de intervenção pela legislação do Estado de São Paulo (DECISÃO DE DIRETORIA Nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005) Fonte. <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/valores.asp> - acesso 22/10/2006.



Figura 1. Microcosmos utilizados no experimento de solos contaminados.

3.2.3 Respiração microbiana (Liberação de CO₂)

O CO₂ liberado pelas amostras de solo foi capturado por meio de um aparato composto por suporte metálico e copo plástico de 50 mL com 20 mL de NaOH 0,25 M, acondicionados dentro de cada microcosmo. Em períodos de tempo pré-determinados os frascos foram abertos, a solução de NaOH recebeu 1 mL de BaCl₂ 1M e foi titulado com HCl 0,5 M, utilizando fenolftaleína como indicador. A solução do HCl 0,5 M foi padronizada com Tris, conforme Tedesco *et al.* (1995). Uma amostra com umidade igual ao solo dos frascos foi utilizada para determinação da umidade gravimétrica, sendo a produção de CO₂ expressa em kg de solo seco.

A produção de C-CO₂ foi quantificada através da fórmula de Stotzky (1965): C-CO₂ (mg kg⁻¹ de solo) = (B-T) x eq x M x 2,5 onde, **B** é o volume (mL) da solução de HCl gasto para titular a prova em branco (frasco sem solo); **T** é o volume (mL) da solução de HCl gasto para titular os tratamentos; **eq** é o equivalente-grama do C, que é 6; **M** é a

molaridade da solução padronizada de HCl e **2,5** é o fator de correção para quilograma de solo.

3.2.4 Biomassa microbiana e coeficiente metabólico (qCO_2)

A biomassa microbiana do solo (BMS) foi avaliada pelo método de fumigação-extração proposto por Vance *et al.* (1987). Amostras de 2 g de solo foram retiradas de cada microcosmo e separadas em duas sub-amostras de 1 g. Estas foram submetidas respectivamente a, fumigação seguida de extração ou extração imediata após a pesagem, para a sub-amostra que não sofreu fumigação.

A fumigação foi processada dentro de um dessecador, no qual foram colocadas as amostras, recipientes contendo água para manter a umidade e clorofórmio ($CHCl_3$).

Para a saturação da atmosfera foi criado vácuo no interior do dessecador até que o recipiente com $CHCl_3$ começasse a borbulhar. Após a completa saturação da atmosfera foi realizada a incubação por 24 h à temperatura ambiente. Passado este período de tempo, o $CHCl_3$ foi removido por aspirações sucessivas.

Na seqüência, as amostras receberam 5 mL de K_2SO_4 0,5 M pH 6,5 procedendo-se à extração em agitador com movimento circular horizontal a 220 rpm por 30 min. Finalizada a extração o conteúdo foi decantado por 30 min e realizada a filtração.

A determinação do carbono nos extratos fumigado e não fumigado foi feita por dicromatometria, a partir da retirada de uma alíquota de 0,8 mL do extrato, adicionando-se 0,2 mL de $K_2Cr_2O_7$ 0,066 M, 1 mL de H_2SO_4 e 0,5 mL de H_3PO_4 . A mistura foi aquecida até ebulição por 5 min. Após o resfriamento, adicionou-se 8 mL de água destilada e 3 gotas de difenilamina (10 g L^{-1} em ácido sulfúrico concentrado). Com a adição do indicador a solução passa da cor amarela para violeta. O excesso de dicromato foi titulado com $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 0,033 M até completa viragem. Frascos sem solo (ensaio em branco) contendo todos os reagentes receberam o mesmo tratamento dado às amostras, sendo usados como controle.

O carbono (C) extraído do solo foi calculado pela seguinte fórmula:

$$C\text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = (V_b - V_a) \cdot M \cdot 0,003 \cdot 5 \cdot (0,8 \cdot P_s)^{-1} \cdot 10^6$$

Onde: C é o carbono extraído do solo; Vb (mL) é o volume do sulfato ferroso amoniacoal gasto na titulação da solução controle (branco); Va (mL) = volume gasto na titulação da amostra; M = molaridade exata do $(\text{NH}_4)_2 \text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; Ps (g) = massa de solo seco.

O cálculo da BMS foi dado pela fórmula:

$$\text{BMS (mg kg}^{-1}\text{)} = \text{FC kc}^{-1}$$

Onde: BMS é a biomassa de carbono microbiano do solo em mg de C por kg de terra ($\mu\text{g g}^{-1}$); FC é a diferença entre a quantidade de C (mg kg^{-1}) recuperada no extrato da amostra fumigada e a recuperada na amostra não fumigada; kc = fator de correção.

O fator de correção (kc) em situações que exijam maior exatidão deverá ser calculado para cada tipo de solo. Como para os solos do Brasil o fator ainda não foi determinado, pode-se utilizar o valor 0,33 preconizado por Sparling & West (1988), a fim de expressar a fração do C da BMS recuperada após o processo de fumigação-extração.

O coeficiente metabólico ($q\text{CO}_2$) foi determinado como a atividade microbiana (respiração C- CO_2) por unidade de biomassa microbiana, como descrito por Anderson (1994).

3.2.5 Atividade enzimáticas

3.2.5.1 Desidrogenase

O método utilizado para este ensaio foi o proposto por Alef & Nannipieri (1998), no qual alíquotas de um grama (1 g) de amostras de solo dos microcosmos foram pesadas dentro de tubos de ensaio e misturados com 1 mL de solução de cloreto de trifetil tetrazolium (TTC). Os tubos foram hermeticamente fechados e incubados a 30 °C por 24 h. Após a incubação foram adicionados 8 mL de acetona em cada tudo e estes agitados vigorosamente e incubados à temperatura ambiente por 2 h no escuro, agitando-se manualmente os tubos a intervalos de 30 min. O conteúdo do sobrenadante foi coletado e filtrado, sendo este submetido à leitura em espectrofotômetro a 546 nm, contra o branco.

A quantificação foi realizada com base em uma curva de calibração. Para esta foram pipetados 0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mL de solução padrão de trifetil formazan (TPF) em balões volumétricos de 50 mL e adicionados 8,3 mL de solução tampão de Tris pH 7,6. O volume final de 50 mL foi ajustado com acetona para obtenção das seguintes concentrações: 0; 5; 10; 20; 30 e 40 $\mu\text{g TPF mL}^{-1}$.

Para o cálculo foi utilizado a seguinte fórmula:

$$\text{TPF } (\mu\text{g g}^{-1}\text{solo}) = \text{TPF } \mu\text{g mL}^{-1} \times 9$$

Preparo das soluções:

- Tampão Tris: 12,1 g de Tris (hydromethyl)-aminomethane em 700 mL de água destilada completando-se o volume 1000 mL. O pH foi ajustado para 7,8 com HCl.
- TTC: 1,5 g de TTC em 80 mL do tampão e completando-se o volume para 100mL.
- TPF: 50 mg de TPF em 80 mL de acetona ($500 \mu\text{g de TPF mL}^{-1}$) e completando-se o volume para 100 mL.

3.2.5.2 Lipase

Para a realização deste ensaio utilizou-se o método proposto por Marguesin *et al.* (2002), no qual 0,1 g de solo foi colocado em tubo de centrífugas com 5 mL de tampão fosfato, misturado, e incubado em banho-maria a 30 °C por 10 min. Após incubação foram adicionados 50 μL de p-nitrofenil butirato (pNPB) sendo realizada incubação em banho-maria como anteriormente realizado. Após 10 min, a reação enzimática foi interrompida em banho de gelo e o conteúdo dos tubos centrifugados a 2000 g a 4 °C por 5 min. O sobrenadante foi pipetado sobre o gelo e imediatamente lida a absorbância a 400 nm contra o branco. Sempre que a leitura foi superior a 2 as amostras foram diluídas em tampão fosfato. Para a quantificação foi construída uma curva padrão a partir de uma solução padrão de 100 $\mu\text{g pNP mL}^{-1}$ em tampão fosfato. As concentrações da curva foram 0; 25; 50; 75; 100 e 125 $\mu\text{g pNP}$, com volume final de 5 mL.

O cálculo foi realizado com base na seguinte fórmula:

$$\text{pNPB } (\mu\text{g.g}^{-1}) = (\mu\text{g pNPB mL}^{-1})/0,1$$

Preparo das soluções:

- Tampão fosfato: Foi preparado solução tampão de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 100 mM e ajustado o pH (7,25).
- Solução de pNPB: foi preparado solução de p-nitrofenil butirato (pNPB) 100 mM diluído em 2-propanol.

3.2.5.3 β -Glucosidase

Para este ensaio, seguindo o método proposto por Schimitz (2003), 1 g de solo foi pesado em frasco Erlenmeyer de 50 mL e adicionado 0,25 mL de tolueno, 4 mL de tampão universal modificado (MUB) pH 6,0 e 1 mL de solução p-nitro- fenil- β -D-glucosideo (PNG). Os frascos foram fechados, agitados e incubados a 37 °C por 1 hora. Após a incubação foi adicionado 1 mL de solução de CaCl_2 0,5 M, 4 mL de solução tampão Tris 0,1 M pH 12. O conteúdo dos frascos foi agitado por alguns segundos e a suspensão foi filtrada em papel filtro Whatman nº 2. O filtrado foi lido imediatamente em espectrofotômetro a 400 nm. Para quantificar o conteúdo de p-nitrofenol do filtrado foi construída uma curva de calibração contendo 0, 10, 20, 30, 40 e 50 μg do reagente. Quando a intensidade do filtrado excedia à do padrão de p-nitrofenol, o mesmo foi diluído com solução Tris 0,1 M pH 10 até que a leitura do espectrofotômetro estivesse dentro dos limites da curva de calibração.

Preparo das soluções:

- Tampão universal modificado (MUB): Para a solução estoque deste foram dissolvidos 12,1 g de tris (hidroximetil) aminometano (Tris), 11,6 g de ácido maleico, 14,0 g de ácido cítrico e 6,3 g de ácido bórico (H_3BO_3) em 488 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1M sendo a solução ajustada para o volume final de 1 L com água destilada. Para preparação do MUB pH 6,0 foi adicionado 200 mL da solução estoque em um Becker de 500 mL sendo realizado titulação com ácido clorídrico (HCl) 0,1 M. O volume foi transferido para um balão de 1L e ajustado o volume com água destilada.
- Solução de PNG (0,05 M): Foi dissolvido 0,654 g de PNG em 40 mL de MUB pH 6,0 e o volume ajustado para 50 mL com MUB de mesmo pH.

- Solução de CaCl_2 (0,5 M): Foram dissolvidos 73,5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ em 700 mL de água, e o volume ajustado para 1 L com água.
- Solução de NaOH (0,5 M): Foram dissolvidos 20 g de NaOH em 700mL de água, e o volume ajustado para 1 L com água.
- Solução de Tris (0,1 M) pH 10: Foram dissolvidos 12,2 g de Tris em 800 mL de água, e o volume ajustado para 1L com água.
- Solução extratora Tris (0,1 M) pH 12: Foram dissolvidos 12,2 g de Tris em 800 mL de água, ajustar o pH para 12 por titulação com NaOH 0,5 M, e o volume ajustado para 1 L com água.
- Solução padrão de p -nitrofenol: Foi dissolvido 1,0 g de p -nitrofenol em 700 mL de água, e o volume ajustado para 1 L com água.
- Todas as soluções foram armazenadas sob refrigeração.

3.2.5.4 Fosfatase ácida

Os procedimentos de análise da atividade de fosfatase ácida estão baseados em um princípio similar ao da β -glucosidase, no qual a hidrólise de p-nitrofenil fosfato libera p-nitrofenol, o qual é extraído quantitativamente do solo e medido colorimetricamente. O tolueno é utilizado para inibir a atividade microbiana no momento da incubação (Schimitz, 2003).

Amostras de 1 g de solo foram colocadas em Erlenmeyer de 50 mL, aos quais foram adicionados 0,2 mL de tolueno, 4 mL de MUB pH 6,5, 1 mL de solução p-nitrofenil fosfato (PNP). Estes foram agitados por alguns segundos para homogeneização do conteúdo e incubados a 37 °C por 1 h.

Após remoção da tampa, foi adicionado 1 mL de CaCl_2 0,5 M e 4 mL de NaOH 0,5 M, e o frasco foi agitado por alguns segundos e a suspensão de solo foi filtrada em papel filtro Whatman nº 2.

Os procedimentos foram realizados da mesma forma que os descritos anteriormente para a atividade da β -glucosidase e Aril-sulfatase.

Preparo das soluções:

- Tolueno, tampão modificado universal (MUB) pH 6,5, a solução estoque MUB foi titulada com HCl 0,1 M, cloreto de cálcio 0,5 M, hidróxido de sódio 0,5 M e solução padrão de p-nitrofenol, foram preparados como descrito para análise de β -glucosidase.

- Solução de p-nitrofenil fosfato 0,05 M: Foi dissolvido 0,840 g de p-nitrofenil fosfato dissódico tetra-hidratado em 40 mL de MUB pH 6,5, e o volume ajustado para 50 mL com o mesmo tampão. A solução foi armazenada sob refrigeração.

3.2.5.5 Arilsulfatase

Para esta análise 1 g de solo foi adicionado em um frasco Erlenmeyer de 50 mL, com 0,25 mL de tolueno, 4 mL de tampão de acetato, 1 mL de solução p-nitrofenil sulfato (PNS), sendo o conteúdo final agitado por alguns segundos para misturar os componentes, tampado e incubado a 37 °C por 1 h (Schimitz, 2003).

Após a incubação foram adicionados 1 mL de CaCl_2 0,5 M e 4 mL de NaOH 0,5 M, sendo o conteúdo agitado, decantado e a suspensão de solo filtrada em um papel de filtro Whatman nº 2.

Os procedimentos na seqüência foram realizados da mesma forma que os descritos anteriormente para a atividade da β -glucosidase.

Preparo das soluções:

- Tampão de acetato 0,5 M pH 5,8: Foram dissolvidos 68 g de acetato de sódio tri-hidratado em 700 mL de água, adicionado 1,70 mL de ácido acético glacial (99%), e diluído o volume a 1L com água.

- Solução de p-nitrofenil sulfato 0,05 M: Foi dissolvido 0,614 g de p-nitrofenil sulfato de potássio em 40 mL de tampão de acetato, e diluído a solução a 50 mL com tampão. Armazenado sob refrigeração a 4 °C.

- Soluções de cloreto de cálcio 0,5 M, hidróxido de sódio 0,5 M, e solução padrão de p-nitrofenol foram preparadas como descrito para atividade de β -glucosidase.

3.2.6 Contagem da microbiota heterotrófica

A quantificação da população microbiana heterotrófica (microrganismos cultiváveis *in vitro*) foi determinada pela contagem em placa do número de colônias (células viáveis). Suspensões contendo 1 g de solo com 9 mL de solução de pirofosfato (0,28%) foram agitadas por 20 min a 150 rpm. Diluições seriadas apropriadas foram realizadas em solução salina de NaCl 0,9% e 0,1 mL foi inoculado por espalhamento em superfície de meio com a seguinte composição (g L^{-1}): glicose, 0,50; extrato de levedura, 0,50; caseína, 0,50; amido solúvel, 0,50; piruvato de sódio, 0,30; K_2HPO_4 , 0,30; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 e Agar, 15. As mesmas foram incubadas a 30 °C por 48 h antes da contagem das colônias (Santos, 2004).

3.2.7 Contagem da microbiota degradadora

Os procedimentos adotados para a diluição seriada e plaqueamento foram iguais aos utilizados para quantificação da microbiota heterotrófica, seguindo o método de Santos (2004). A população microbiana degradadora foi quantificada em placas contendo meio mineral sólido com a seguinte composição de macronutrientes (g L^{-1}): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,04; KH_2PO_4 , 0,1; NaCl, 0,8; NH_4Cl , 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 e KCl, 0,1 e micronutrientes na concentração, em mg L^{-1} : $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,425; ZnCl_2 , 0,05; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,015; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,01; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01; Na_2SeO_4 , 0,01; $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, 12,1 e ágar, 15, conforme modificação de Santos (2004). Como única fonte de carbono foi utilizado 20 μL de óleo diesel esterilizado por filtração (0,22 μm) que foram adicionados sobre o meio após completa solidificação. Após o inóculo as placas foram incubadas a 30 °C por 48 h.

3.2.8 Determinação de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH)

A determinação dos TPH foi realizada por espectroscopia no Infravermelho (ATR-FTIR), segundo método 418.1 modificado da Agência Americana de Proteção Ambiental (USEPA).

Amostras de 2 g de solo, juntamente com 1 g de sulfato de sódio anidro foram adicionadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL e o conteúdo misturado vigorosamente,

sendo posteriormente adicionados 5 mL de tetracloreto de carbono (CCl_4). Após a adição, o frasco foi imediatamente fechado e agitado a 150 rpm durante 1 h. Em seguida, o conteúdo foi filtrado em filtro de celulose e submetido a uma coluna de vidro com 8 g de óxido de alumínio. O espectro foi obtido contra CCl_4 padrão em número de ondas variando de 3200 a 2800 cm^{-1} , com velocidade de escaneamento de 500 $\text{cm}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Para a geração de cada espectro foram realizadas 64 leituras, sendo corrigidas as imperfeições no transformado de Fourier.

3.2.9 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de solo dos microcosmos foi realizada com o kit Fast DNA® *SPIN Kit for soil* (Q-BIO gene / BIO-101), seguindo o protocolo do fabricante. <http://www.bio101.com/protocols/dna-kits/p-fastdna-soil.html>

3.2.10 PCR-DGGE

O par de primers utilizado, homólogos a regiões conservadas do DNAr 16S para o Domínio Bacteria, foi o 968f e o 1401r (Heuer et al., 1997), sendo que o grampo GC foi acoplado ao 968f. Foram usados 5 μL de DNA total, sem diluição, em reações de 25 μL contendo 2,0 U de Taq DNA polimerase (GE Healthcare); 1 x Tampão da Taq (GE Healthcare); 0,2 mM de uma mistura de dNTP e 0,4 μM de cada primer. O programa de amplificação consistiu de um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 5 min; 10 ciclos a 94 °C por 1 min; 58 °C por 30 seg, abaixando 0,5 °C /ciclo, e 72°C por 2 min; outros 25 ciclos de 94 °C por 1 min; 53 °C por 30 seg e 72°C por 2 min; e uma extensão final a 72 °C por 2 min. Os resultados de amplificação dos fragmentos do gene para RNAr 16S foram confirmados em géis de agarose 1,2 %, corados com brometo de etídio 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, antes de se proceder à eletroforese em gel desnaturante.

Cerca de 40 μL da reação de PCR foram aplicados no gel DGGE, cujas condições de eletroforese foram 50 V por 14 h a 60 °C. O gradiente de agentes desnaturantes uréia e formamida variou de 50 a 70 % (Oliveira et al., 2006).

3.2.11 Análise estatística

A significância estatística dos resultados dos microcosmos foram determinados utilizando a análise de variância e aplicação de teste para comparação de médias (de triplicatas) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Todos os testes foram realizados pelos softwares SigmaStat 3.5 e Systat 12. Todos os gráficos foram plotados utilizando-se o software SigmaPlot 10.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Seleção das amostras de solo

O critério adotado para escolha do local de coleta das amostras de solo foi a ausência de um histórico de contaminação por hidrocarbonetos e metais pesados, visando a obtenção de uma diversidade microbiana autóctone não adaptada à presença destes poluentes.

Desta forma, o local onde as amostras foram coletadas possui um histórico conhecido de manejo. Esta área, pertencente ao Campo Experimental da Faculdade de Engenharia Agrícola, tem sido manejada ao longo dos últimos dezenove anos somente em experimentos de física do solo. Assim, pode-se inferir que a microbiota presente nas amostras não possui genes previamente induzidos pela presença de hidrocarbonetos e metais pesados.

Além disso, por ser uma área utilizada em experimentos de física do solo, apresenta uma cobertura vegetal bem estabelecida durante a maior parte do ano, com exceção do período de seca na qual a vegetação nativa entra em estado de hibernação, para germinar no período de melhoria das condições ambientais. Assim, a diversidade microbiana e características físico-químicas das amostras aproximam-se muito daqueles de campos nativos da região, tornando mais eficaz a descrição e avaliação dos efeitos de um derramamento de óleo cru em áreas não impactadas.

De acordo com as tabelas 1 e 2 pode-se verificar que as amostras de solo possuem baixos teores de macronutrientes (P, Ca, Mg, K e S) essenciais ao metabolismo microbiano, e pH acima de 5,0, o qual inibe a forma tóxica livre de alumínio (Al^{3+}). Contudo, apresenta alto teor de argila e matéria orgânica que são responsáveis pela presença de cargas na matriz do solo. Estas cargas são responsáveis por interações físico-químicas que regem a biodisponibilidade e bioacessibilidade de moléculas orgânicas, inorgânicas e íons no solo.

3.3.2 Respiração Microbiana

A respiração microbiana representa a soma de todos os processos metabólicos, produzindo CO_2 como resultado da captura de O_2 pelos microrganismos aeróbios vivos ativos no solo (Anderson, 1982).

A figura 2 reporta a liberação acumulada de C-CO_2 de amostras de solo, sem histórico de contaminação, tratadas com distintas dosagens de hidrocarbonetos de petróleo, na ausência e presença de metais pesados.

Durante os primeiros cinco dias de observação o conteúdo mensurado de C-CO_2 acumulado não diferiu entre os distintos tratamentos. A partir do 6º dia houve um acentuado aumento na liberação de CO_2 , sendo que a partir do 11º dia todos os solos tratados apresentaram taxas de liberação superiores ao solo controle, que persistiu até o final do experimento.

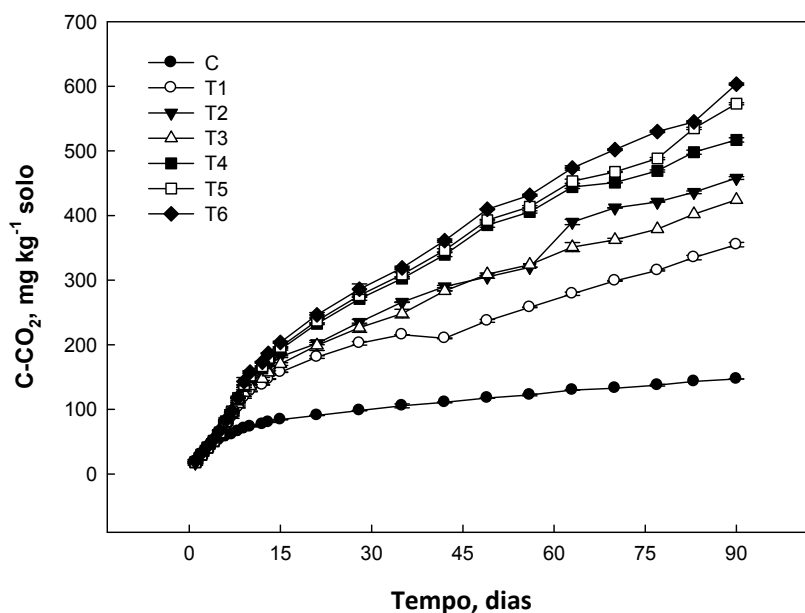


Figura 2. Produção acumulada de C-CO_2 de amostras de solo contaminadas com hidrocarbonetos, na ausência e presença de metais pesados. Os valores são médias de três repetições. Todos os desvios padrões foram menores que os símbolos da legenda do gráfico.

Ao final de 90 dias de experimento a maior produção de C-CO₂ foi observada no tratamento T6, ao qual foram adicionados hidrocarbonetos de petróleo, cromo e cobre, sendo que este obteve uma liberação de CO₂ 69,8% superior ao tratamento T1, que teve a menor produção entre os solos contaminados.

Embora tenha sido observada esta grande diferença entre os solos com maior (T6) e menor (T1) liberação de C-CO₂, não houve diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,01$) entre os tratamentos T4, T5 e T6. Contudo, estes solos apresentaram as maiores produções de CO₂ e diferenças significativas com relação a todos os demais tratamentos. Desta forma, pode-se inferir que os solos tratados com hidrocarbonetos na presença de metais, apresentaram um efeito sinérgico dos contaminantes que resultou em um aumento significativo da respiração microbiana comparada com os solos sob efeito único dos hidrocarbonetos. Em contraste, o trabalho realizado por Renella *et al* (2007) mostrou que a adição de lodo contaminado com os metais pesados Cd e Zn, não causou qualquer alteração significativa na produção acumulada de C-CO₂ após um período de 180 dias. Contudo, Shi *et al.* (2002) constataram que a maior respiração microbiana, entre vários solos tratados foi obtida em solo contaminado com hidrocarbonetos e metais pesados.

A respiração basal do solo fornece uma informação geral das condições fisiológicas do pedoeossistema, onde esta atividade revela um panorama da utilização da energia pela microbiota, expressa pela eficiência da degradação de compostos orgânicos pelos microrganismos (Kizilkaya *et al.*, 2004).

Segundo Shi *et al* (2002) sob o estresse de metais pesados, as atividades microbianas geralmente tendem a aumentar devido a uma necessidade maior de energia para manutenção celular e diminuição da eficácia de utilização dos substratos.

O efeito tóxico sinérgico causado pela combinação da presença de hidrocarbonetos e metais pesados é ainda pouco entendido, no entanto este pode ser atribuído ao aumento na permeabilidade de metais pesados em função de alterações na estrutura da membrana citoplasmática das células. Tais alterações são atribuídas à acumulação de hidrocarbonetos na dupla camada lipídica da membrana celular, afetando assim suas propriedades estruturais e funcionais. Como resultado deste acúmulo a

membrana perde sua integridade, permitindo um exagerado aumento na permeabilidade de prótons e ânions. Conseqüentemente, ocorre uma perda da capacidade da bomba de prótons pela alteração do pH intracelular que pode conduzir à morte das células (Sikkema *et al.*, 1995). Com a morte das células ocorre um incremento de material orgânico de fácil decomposição, que é utilizado pela biomassa microbiana resistente, havendo um sensível aumento na liberação de CO₂ (Giller *et al.*, 1998).

Além disso, é possível que na presença de metais pesados haja a formação de complexos estáveis com os substratos que são utilizados na respiração alterando sua biodisponibilidade e diminuindo a eficácia de utilização pelos microrganismos (Landi *et al.*, 2000).

Desta forma, tais aumentos na respiração podem ser atribuídos a uma resposta fisiológica ao estresse da comunidade microbiana frente aos contaminantes (Contin *et al.*, 2002).

3.3.3 Biomassa Microbiana e coeficiente metabólico (qCO_2)

A biomassa microbiana representa a parte viva da matéria orgânica do solo, excluindo-se animais e raízes de plantas. Embora com pequena participação no conteúdo total da matéria orgânica, não ultrapassando 5%, apresenta funções fundamentais no ecossistema solo. Está diretamente ligada aos principais ciclos biogeoquímicos, tais como, ciclo do carbono, do nitrogênio, do fósforo e do enxofre, além de participar ativamente das transformações de compostos xenobióticos orgânicos e imobilização de metais pesados (Nannipieri *et al.*, 2002). Por estas razões tem sido utilizada como um sensível bioindicador das modificações decorrentes da ação antrópica sobre os microrganismos do solo.

Com base nas análises estatísticas apresentadas na figura 3, pode-se verificar um evidente efeito da adição dos hidrocarbonetos de petróleo e efeito combinado dos hidrocarbonetos de petróleo e metais pesados. A presença destes contaminantes ocasionou distintas reduções na biomassa microbiana entre os tratamentos, bem como dentro de cada tratamento em função do tempo. Todos os solos que receberam doses dos

contaminantes apresentaram uma redução na biomassa microbiana em função do tempo que persistiu até o final experimento. A maior redução da biomassa (em valores absolutos) aos 90 dias de experimento foi observada para o tratamento T6, o qual recebeu a maior dosagem de hidrocarbonetos de petróleo combinado com presença dos metais cromo e cobre. Este tratamento apresentou uma redução de 51% da biomassa microbiana inicial, porém não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) aos tratamentos T3, T4, T5. O solo tratado com a maior dosagem de hidrocarbonetos de petróleo livre da presença de metais pesados (T2) apresentou uma redução de 26,5% da biomassa inicial. Esta redução da biomassa microbiana no T2 foi menor que a ocorrida no tratamento T3 que obteve uma redução de 45,6% de redução da biomassa, submetido a uma menor dosagem de hidrocarbonetos de petróleo, porém na presença do metal cromo. Assim, podemos sugerir com base nos resultados obtidos que o efeito combinado de hidrocarbonetos e metais pesados apresenta um efeito tóxico sinérgico maior que o apresentado somente pela presença de hidrocarbonetos, causando uma maior redução na biomassa microbiana conferida pela morte dos microrganismos.

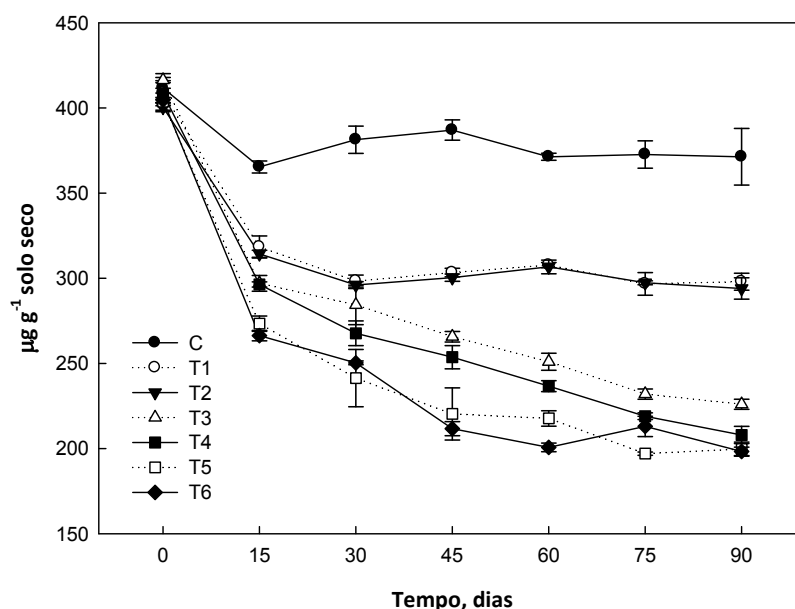


Figura 3. Variações da biomassa microbiana ($\mu\text{g g}^{-1}$ solo seco) durante 90 dias de experimento. As barras representam os desvios padrões.

É provável que os microrganismos do solo possuam uma grande diversidade de genes responsáveis pela degradação de compostos orgânicos, uma vez que no ambiente solo moléculas orgânicas complexas como lignina e outros exsudatos de plantas estão constantemente sendo introduzidos. Já os metais pesados, embora amplamente distribuídos no solo, ocorrem em baixas concentrações. Uma vez que alcancem níveis tóxicos, apresentam um efeito agudo pela incapacidade de biotransformação por maior parte da população (Nies, 1999). Isso provavelmente aconteça pela ausência de genes que confirmem resistência aos microrganismos presentes ao seu entorno. A biodisponibilidade dos metais pesados no solo é dada pela interferência de parâmetros físico-químicos tais como: pH, teor de matéria orgânica, granulometria, entre outros, que são alterados pela presença dos hidrocarbonetos (Nies, 2003). Em suma, é possível que as alterações decorrentes da presença dos hidrocarbonetos possam estar acentuando a biodisponibilidade dos metais pesados e causando um elevado efeito tóxico como visto no experimento.

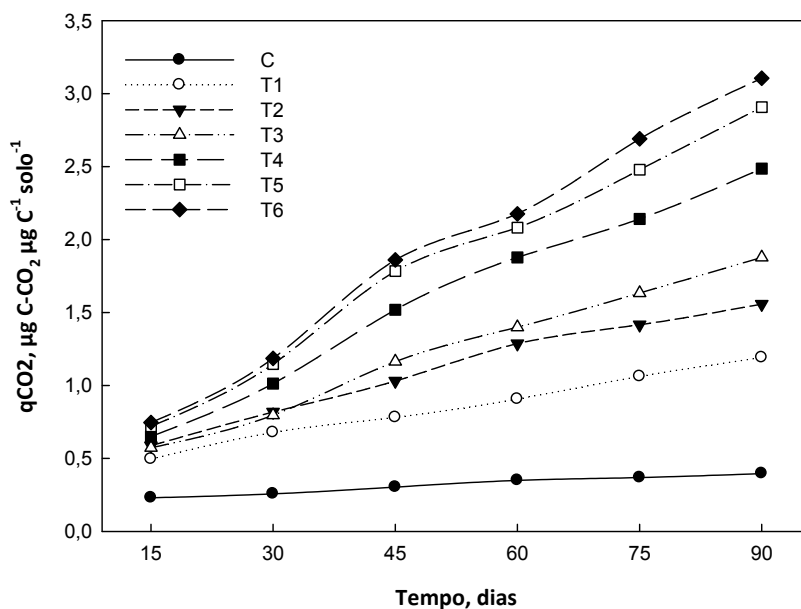


Figura 4. Coeficiente metabólico de amostras de solo submetidas a diferentes tratamentos com hidrocarbonetos de petróleo e metais pesados.

Como a biomassa catalisa transformações bioquímicas essenciais à qualidade do solo e funcionalidade do ecossistema com enormes reflexos nos processos globais, torna-se importante conhecer, além da quantidade da biomassa, a fração desta que é ativa (Moreira & Siqueira, 2002). Desta forma, medidas de coeficiente metabólico (qCO_2) podem dar um enfoque mais interpretativo e estabelecer relações mais dinâmicas entre biomassa microbiana do solo e sua atividade.

É possível verificar na figura 4 que todos os solos submetidos a hidrocarbonetos de petróleo e metais pesados apresentaram crescentes valores de qCO_2 ao longo do tempo, que persistiu até o final dos 90 dias de experimento. O maior aumento no qCO_2 foi verificado no T6, que apresentou um crescimento de aproximadamente 4 vezes na liberação de $C-CO_2$ por unidade de biomassa microbiana ativa, superando em aproximadamente 3 vezes os valores de qCO_2 do tratamento T1, que apresentou a menor variação entre os solos tratados. Estes resultados sugerem que com o decorrer do experimento houve uma diminuição da diversidade microbiana presente na biomassa do solo. Assim, devido à grande pressão de seleção imposta pela presença dos contaminantes, os microrganismos que não apresentaram mecanismos de resistência morreram, dando lugar somente aos microrganismos que apresentaram algum mecanismo especializado de resistência, que pode ser verificado pela alta atividade metabólica por unidade de biomassa microbiana (Margesin, 1999). A menor diversidade microbiana tornou-se mais especializada e apta para utilização dos hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia. Contudo, é possível que a presença dos metais pesados cause um maior estresse na microbiota, o que justifica o maior gasto de energia para a manutenção celular quando comparamos o efeito de hidrocarbonetos e o efeito combinado de hidrocarbonetos e metais pesados.

3.3.4 Atividade Desidrogenase

Processos de oxidação biológica de compostos orgânicos estão amplamente relacionados com a desidrogenação conduzida por enzimas desidrogenases, que são

oxirredutases essenciais ao metabolismo energético da respiração, estando presente somente em células vivas e intactas (Riffaldi *et al.*, 2006).

Conforme os dados apresentados na figura 5 é possível verificar que todos os solos contaminados apresentaram baixas atividades da desidrogenase, sem ocorrer significativas alterações de comportamento ao longo do experimento, com exceção dos tratamentos T1 e T2. Nestes tratamentos pode-se observar consideráveis aumentos na atividade enzimática, que persistiram aproximadamente até o 45º dia, momento pelo qual começou uma tendência de declínio.

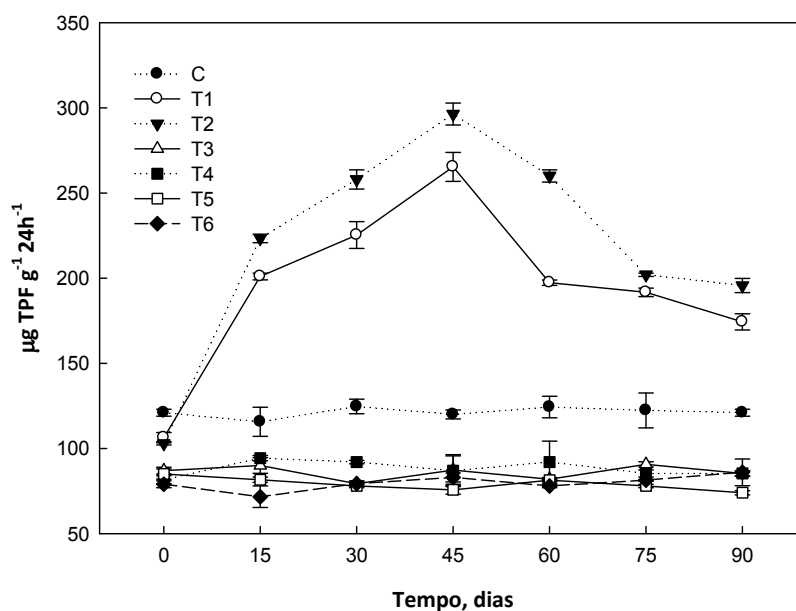


Figura 5. Atividades desidrogenase ($\mu\text{g TPF g}^{-1} 24\text{h}^{-1}$) de solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados. As barras representam os desvios padrões.

Estes resultados sugerem que após um período inicial de adaptação da microbiota frente aos hidrocarbonetos, estes compostos começaram a ser degradados, resultando em uma maior demanda por energia que corresponde ao aumento da atividade desidrogenase. Após este período de intensa atividade microbiana visualiza-se uma redução constante ao longo do tempo da atividade desidrogenase. As reduções nas

atividades das desidrogenases refletem uma diminuição das atividades metabólicas celulares, que possivelmente ocorram pela redução quantitativa da fração orgânica de maior degradabilidade, tais como n-alcanos, predominando desta forma frações mais recalcitrantes que são degradadas por pequena parcela da população. Além disso, devido à alta atividade celular por um longo período, pode ter ocorrido uma depleção de nutrientes pela alta demanda e baixa disponibilidade destes minerais uma vez que não houve suplementação que conferisse uma bioestimulação.

Desta forma, os resultados apresentados anteriormente estão em conformidade com os obtidos por Margesin (2000) e Riffaldi *et al.* (2006), os quais obtiveram uma crescente atividade de desidrogenase logo após a adição dos hidrocarbonetos, com redução desta atividade a partir do declínio dos compostos orgânicos no solo.

Diferentemente, os solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo e metais pesados (T3, T4, T5 E T6) apresentaram atividade de desidrogenase menor que o solo não contaminado, não ocorrendo grandes variações durante todo experimento. É possível que a presença dos metais pesados suprima severamente a atividade de várias enzimas, entre elas a desidrogenase, por ação indireta. Também é provável que as reações enzimáticas sejam inibidas pelos metais, os quais podem complexar o substrato, se combinar com os sítios ativos das enzimas ou ainda reagir com o complexo enzima-substrato (Hinojosa *et al.*, 2004). Grupos sulfidríla estão presentes na maioria das enzimas, servindo de sítio catalítico ou estando envolvidos na manutenção da correta conformação da proteína. Os metais podem reagir com estes grupos causando a inativação ou inibição da atividade enzimática (Shaw & Raval, 1961).

3.3.5 Atividade de Lipase

A lipase é uma enzima produzida pela grande maioria dos microrganismos do solo, sendo utilizada para degradar lipídeos em glicerina e ácidos graxos. Estudos realizados por Jaeger *et al.* (1994) e Margesin *et al.* (2000a) demonstraram ótima correlação negativa da atividade desta enzima com a presença de hidrocarbonetos de petróleo.

Observando a figura 6 podemos verificar que nos primeiros 30 dias de exposição dos microrganismos do solo aos contaminantes, a atividade da lipase foi baixa não havendo grandes variações entre os distintos tratamentos. A partir do 45º dia de experimento houve um significativo aumento da atividade da lipase em todos os solos contaminados, sendo contudo mais acentuado nos tratamentos T2 e T1, respectivamente. Esta tendência persistiu até o final dos experimentos, momento no qual a maior atividade, apresentada pelo T2, foi aproximadamente 2,5 vezes maior que a menor atividade (T5) entre os solos contaminados. Fica evidente que as maiores atividades corresponderam aos solos contaminados somente por hidrocarbonetos de petróleo, uma vez que os solos contaminados por hidrocarbonetos na presença de metais (T3 a T6), independentemente das dosagens e tipo de contaminante, tiveram uma tendência de comportamento semelhante, havendo um pequeno aumento na atividade de lipase a partir do 45º dia, se comparado ao solo não contaminado (C).

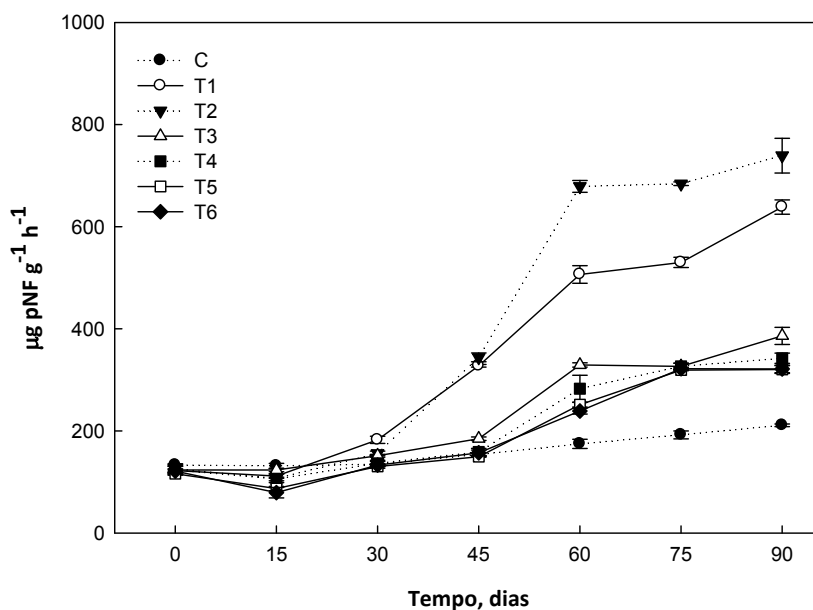


Figura 6. Atividade de lipase em distintos solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados. Os dados são as médias das amostras em triplicata e as barras representam os desvios padrões.

De acordo com os resultados obtidos por Margesin *et al.* (1999), os quais avaliaram atividades da lipase para monitorar a biodegradação de hidrocarbonetos, os valores máximos alcançados por esta enzima foram verificados entre 90 e 100 dias de exposição aos compostos orgânicos, em solo não fertilizado e, 30 dias para solos sob efeito de bioestimulação. Este padrão de comportamento apresentado pela lipase durante o processo de biodegradação é completamente distinto de outras atividades biológicas do solo (respiração, desidrogenase, ATP, entre outros), que tendem a ser maiores logo após a exposição aos hidrocarbonetos, para assegurar a manutenção das atividades celulares vitais sobre estresse. Porém, tão logo comece a redução na taxa de biodegradação ocorre rapidamente o declínio das atividades relacionadas a estes processos (van der Waarde *et al.*, 1995; Margesin & Schirmer, 1997). Em contraste, a atividade de lipase permanece inalterada pela acumulação de compostos tóxicos recalcitrantes, demonstrando atividade durante o curso da biodegradação (Allard & Neilson, 1997). Assim, com base na literatura não se sabe claramente como a lipase atua no processo de biodegradação. Desta forma, assume-se que o sistema enzimático envolvido na degradação de lipídeos seja similar ao envolvido na degradação da fração oleosa dos hidrocarbonetos de petróleo. Acredita-se que, possivelmente isto aconteça devido à fração orgânica inicialmente degradada corresponder a n-alcanos de cadeias curtas, que são degradados por um sistema enzimático específico (oxigenases). Com o avanço da degradação a fração orgânica residual torna-se composta por uma mistura de n-alcanos de cadeia longa (oleofinas) que apresenta uma característica física mais oleosa, que justifica o aumento da atividade de lipase (Margesin *et al.*, 1999).

Avaliando-se os resultados obtidos com os solos contaminados por hidrocarbonetos e metais pesados (T3 a T6), fica evidente que sob estas condições ocorre um efeito combinado destes contaminantes que suprime a atividade desta enzima. Tal efeito pode ser justificado pela grande toxicidade decorrente dos metais pesados, que promove a redução da população microbiana e o aumento no gasto de energia para a manutenção celular. Por esta razão, mesmo os microrganismos metabolicamente mais aptos “selecionados naturalmente” apresentarão uma reduzida capacidade degradativa.

3.3.6 Atividade de β -glucosidase

A atividade de β -glucosidase está diretamente relacionada ao ciclo do carbono, atuando como uma hidrolase responsável pela clivagem hidrolítica de ligações químicas funcionais de compostos orgânicos, sendo responsável por uma importante fonte de energia para os microrganismos e contribuindo efetivamente na manutenção da matéria orgânica do solo (Alef & Nannipieri, 1998).

Na figura 7 observa-se uma tendência de redução da atividade de β -glucosidase inicial ao longo das avaliações cronológicas, sendo que esta tendência também foi reportada por Ceccanti *et al.* (2006).

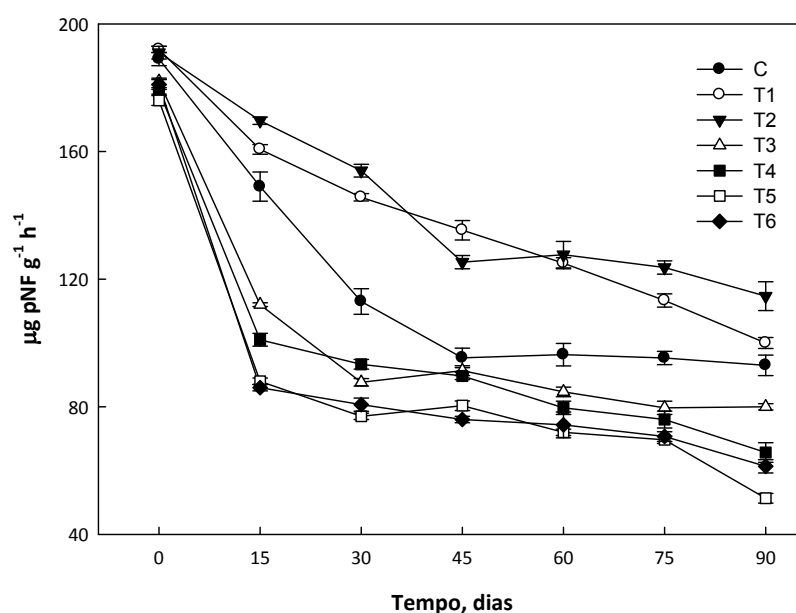


Figura 7. Atividade da β -glucosidase em distintos solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados. Os dados são as médias das amostras em triplicata as barras representam os desvios padrões.

Este comportamento sustenta a idéia que devido ao efeito tóxico agudo causado pelos contaminantes haja uma grande alteração da diversidade microbiana, pela morte dos microrganismos heterotróficos que não apresentem capacidade metabólica de resistência a tais compostos. Durante a sucessão das populações microbianas no solo, os microrganismos resistentes podem se utilizar da biomassa microbiana morta. Assim, como

a β -glucosidase é empregada na degradação de açúcares complexos a açúcares simples como glicose, esta enzima estaria sendo utilizada pela microbiota resistente para degradar os açúcares constituintes das paredes celulares dos microrganismos mortos (Denamou *et al.*, 2006).

Os tratamentos que combinaram hidrocarbonetos e metais pesados (T3 a T6) apresentaram a mesma tendência que os solos contaminados somente com hidrocarbonetos (T1 e T2), contudo, tiveram atividades muito inferiores, sendo menores do que a atividade do solo controle (C). Resultados semelhantes foram obtidos por Lee *et al.* (2002). De acordo com Knight & Dick (2004), a β -glucosidase, por ser uma enzima extracelular, sofre grande influência da matriz do solo, estando sujeita a fortes interações físico-químicas, tais como complexação química e sorção. Desta forma, a presença de íons metálicos pode contribuir fortemente em muitos destes processos, resultando na redução da atividade desta enzima.

3.3.7 Atividade de fosfatase ácida

As fosfatases são enzimas responsáveis pela hidrólise de ésteres de fosfato, que possuem alta especificidade e grande capacidade de ação em diferentes estruturas de substratos (Alef & Nannipieri, 1998).

Conforme os dados apresentados na figura 8, verifica-se comportamentos semelhantes entre todos os solos contaminados até o 15º dia, momento em que começa uma grande diferenciação em termos de atividade para os tratamentos T1 e T2.

Nestes tratamentos, em um período de 15 dias, intervalo de uma verificação, ocorreu um acréscimo na atividade da fosfatase ácida de aproximadamente 37 e 30%, para o T1 e T2, respectivamente, sendo que tais tendências de aumentos continuaram até 60º dia para o T2 e 75º dia para o tratamento T1, havendo posteriormente o declínio em ambos os tratamentos. De acordo com Gianfreda (2005), a atividade de fosfatase possui correlação positiva com o conteúdo total de fósforo, confirmando sua importância no ciclo deste elemento. Contudo, esta enzima possui correlação negativa com o conteúdo de fosfatos, ou seja, é inversamente proporcional ao conteúdo de fósforo lábil. Desta

forma, os aumentos das atividades nos tratamentos T1 e T2, provavelmente tenham acontecido devido à alta atividade metabólica necessária à manutenção da microbiota frente aos contaminantes, demandando grandes quantidades de fósforo.

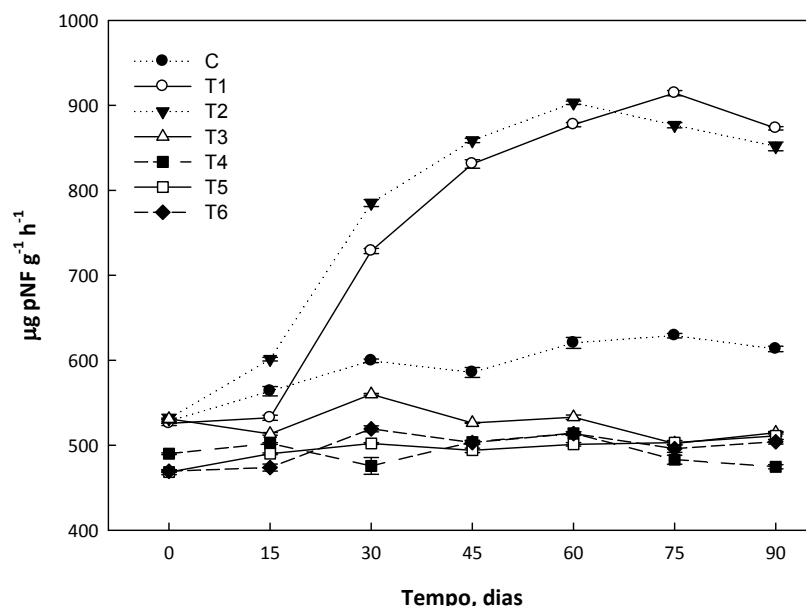


Figura 8. Atividade da fosfatase ácida em distintos solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados. Os dados são as médias das amostras em triplicata e as barras representam os desvios padrões.

Conseqüentemente, como este solo apresenta baixo teor de fósforo mineral (fosfatos), foi rapidamente consumido pelos microrganismos. Frente à depleção deste macronutriente, os microrganismos começaram a utilizar a ação enzimática para mineralizar o fósforo orgânico, presente em constituintes celulares residuais de microrganismos mortos e matéria orgânica do solo, para suprir a demanda metabólica.

Já os solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados (T3 a T6) não sofreram grandes alterações ao longo do experimento e tiveram atividades enzimáticas inferiores ao solo controle. Tais resultados obtidos são semelhantes aos reportados por Wang *et al.* (2007) e Shen *et al.* (2006), os quais observaram uma enorme supressão da atividade da fosfatase ácida em solos contaminados com o herbicida butaclor e

hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), respectivamente, combinados com metais pesados. Por um mecanismo ainda não entendido a presença de metais provoca uma grande diminuição da atividade desta enzima.

3.3.8 Atividade de arilsulfatase

Como todas as sulfatases, esta enzima catalisa a hidrólise de ésteres orgânicos de sulfatos, sendo assim chamada pelo tipo de éster que é hidrolisado (arilsulfatos) (Alef & Nannipieri, 1998).

Conforme os resultados demonstrados na figura 9, observa-se crescentes atividades enzimáticas nos solos contaminados somente com hidrocarbonetos de petróleo, que mantiveram esta tendência até o 45º e 60º dias, respectivamente para os solos T1 e T2. Entre os nutrientes inorgânicos, o enxofre é o quarto mais absorvido, com participação de 1% na composição química celular microbiana (Neidhardt *et al.*, 1990), sendo essencial ao metabolismo.

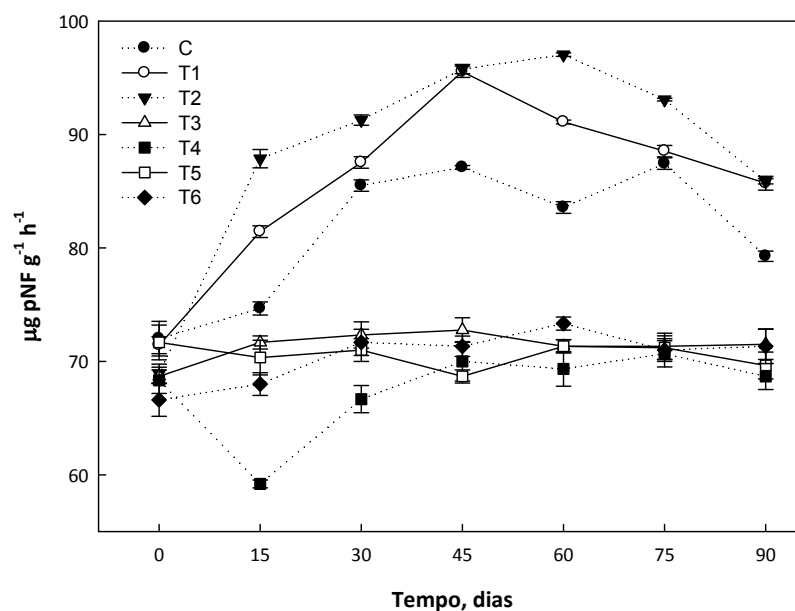


Figura 9. Atividade da arilsulfatase em distintos solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados. Os dados são as médias das amostras em triplicata e as barras representam os desvios padrões.

O solo utilizado no experimento apresenta um baixo teor de enxofre mineral ($2,8 \text{ mg dm}^{-3}$), em se tratando de um latossolo com textura predominantemente argilosa, que confere uma baixa biodisponibilidade do mineral. Assim, provavelmente a carência do nutriente induziu a população a utilizar a ação enzimática para mineralizar sulfatos orgânicos presentes na matéria orgânica e resíduos de células mortas, para suprir o aumento da atividade metabólica necessária à manutenção celular frente à presença dos contaminantes, justificando o comportamento observado.

A partir do 45º dia de experimento ocorreu a diminuição da atividade de arilsulfatase no T1, razão igual, pela qual houve o decréscimo da atividade a partir do 60º dia para o T2. Isto provavelmente se deu uma vez que uma parcela dos hidrocarbonetos já havia sido mineralizada pela microbiota do solo.

Os tratamentos que combinaram hidrocarbonetos e metais pesados apresentaram uma inibição da atividade arilsulfatase, durante todo o experimento, sendo esta inferior ao solo não contaminado. Semelhantes reduções na atividade desta enzima, na presença de metais pesados, foram relatados por Renella *et al.* (2005a), Renella *et al.* (2005b) e Hinojosa *et al.* (2004).

Ao longo deste trabalho, pôde-se verificar que todas as cinco enzimas avaliadas tiveram sua ação inibida quando na presença de metais pesados. Prévios estudos têm demonstrado que quando a microbiota é exposta a metais pesados, seu $q\text{CO}_2$ aumenta, indicando um grande requerimento de energia para a manutenção celular (Brookes, 1995). A baixa eficiência metabólica dos microrganismos do solo na presença dos metais pesados pode ser devido a um “desvio de energia” em adaptações fisiológicas imprescindíveis para a tolerância à toxicidade imposta por tais elementos. Muitas adaptações podem ocorrer, tais como síntese de proteínas e sacarídeos seqüestradores de metais (intra e extracelulares), além de reações bioquímicas para precipitar ou conter metais na superfície celular microbiana (Gadd, 1993). De fato, qualquer mecanismo de adaptação é energeticamente exigente e dependente, aumentando assim as necessidades energéticas para o crescimento microbiano. Desta forma, pode haver uma redução na conversão de substratos em biomassa microbiana e sua utilização na síntese de

enzimas. Isto representa uma grande parte do total de proteínas celulares, justificando as reduzidas atividades enzimáticas (Renella *et al.*, 2005a). Além disso, inúmeras interações físico-químicas entre enzimas e substratos, já explanadas anteriormente, podem ocorrer potencializando tal efeito (Hinojosa *et al.*, 2004).

3.3.9 Contagem de bactérias heterotróficas e degradadoras

Visando a variação populacional bacteriana, aproximada, ocorrida durante o experimento, foram realizadas sucessivas contagens em placas, que avaliou a dinâmica entre heterotróficos e degradadores (cultiváveis).

A população bacteriana heterotrófica foi fortemente reduzida em todos os solos contaminados, apresentando na primeira avaliação (15 dias) uma diminuição de aproximadamente duas ordens de magnitude de 10^6 para 10^4 células, para os tratamentos T1 e T2 (Figura 10).

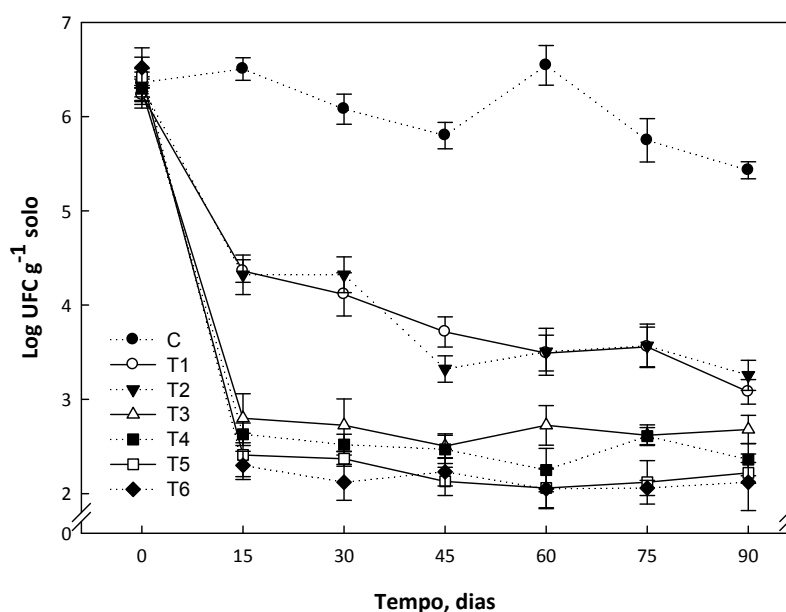


Figura 10. Contagem da população heterotrófica, cultivável, em distintos solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados. Os dados são as médias das amostras em triplicata e as barras representam os desvios padrões.

Essas reduções ainda persistiram até o 45º dia, momento pelo qual alcançaram a menor população de 10^3 células, que ficou estabilizada até o final dos 90 dias de experimento. As reduções foram ainda mais acentuadas nos solos que conciliaram hidrocarbonetos e metais pesados, havendo uma diminuição de aproximadamente quatro ordens de magnitude de 10^6 para 10^2 células da primeira a última avaliação (Figura 10).

Por se tratar de um solo sem histórico de contaminação é compreensível que a população microbiana autóctone sofra consideráveis reduções frente à disposição de compostos tóxicos tais como hidrocarbonetos e metais pesados, como observado no experimento. Estas reduções ocorrem pela ausência de mecanismos que confirmam resistência à maior parte das células bacterianas heterotróficas (Atagana, 2006).

Contudo, uma parcela da população bacteriana apresenta capacidade genética para degradar compostos orgânicos complexos e de resistência tóxica aos metais pesados, presentes em moléculas de DNA cromossomal ou extracromossomal (plasmídeos). Devido a esta capacidade é que podemos verificar um aumento da população degradadora tão logo haja uma contaminação do solo (Leahy & Colwell, 1990).

Como observado na figura 11, todos os solos impactados apresentaram um considerável aumento de degradadores cultiváveis após duas semanas de exposição aos agentes tóxicos. Os maiores aumentos foram verificados para os tratamentos T1 e T2, que partiram de 10^2 e alcançaram aproximadamente 10^6 células por grama de solo. Os solos T3 a T6 tiveram aumentos inferiores aos verificados para o T1 e T2 ao longo de todas as avaliações. Inicialmente estes aumentos foram de 10^2 para 10^3 , chegando ao máximo crescimento após os 75 dias de experimento a 10^4 células.

Com base nestes resultados pode-se inferir que o efeito tóxico combinado dos hidrocarbonetos e metais pesados afetou com maior intensidade a comunidade bacteriana do solo do que somente os hidrocarbonetos, uma vez que houve maiores reduções dos microrganismos heterotróficos e menores aumentos dos degradadores quando expostos aos metais.

Resultados semelhantes foram obtidos por Nakatsu *et al.* (2005), que avaliaram o efeito de hidrocarbonetos poliaromáticos na presença de chumbo e cromo.

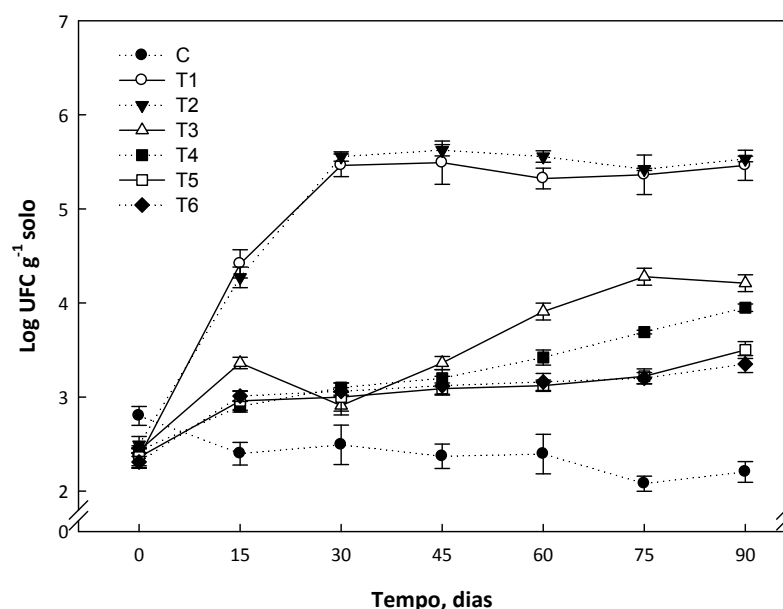


Figura 11. Contagem da população degradadora (cultivável) em distintos solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados. Os dados são as médias das amostras em triplicata e as barras representam os desvios padrões.

De acordo com estes autores, devido à adição simultânea dos contaminantes no solo, não é possível distinguir os efeitos tóxicos causados pelos hidrocarbonetos e pelos metais pesados. Contudo, o delineamento experimental adotado permite inferir que a presença dos metais pesados potencializou o efeito tóxico responsável pelas reduções na população microbiana. A inibição do crescimento pela presença de metais pode ocorrer por inúmeros fatores, sendo que o efeito tóxico apresentado por estes elementos depende da espécie do metal, concentrações e fatores físicos-químicos do solo (Gadd, 1993). A toxicidade de um metal pode ser exercida de diferentes formas. Ions livres podem afetar diretamente as células microbianas por reações entre constituintes celulares e o metal. Contudo, organometais apresentam geralmente maior toxicidade aos microrganismos do que o correspondente íon metálico livre (Lugauskas et al, 2005), sendo o efeito tóxico variável com o número e identidade dos grupos orgânicos presentes na molécula (Cooney et al, 1989; Gadd, 1993). Reduções nas contagens de microrganismos

indicam que funções essenciais foram afetadas ou ocorreram danos nas células microbianas. Metais exercem um efeito severo em específicas funções microbianas que influenciam completamente o metabolismo em geral (Gorbunova & Terekhova, 1995). Tais efeitos incluem o bloqueio de grupos funcionais de moléculas biologicamente ativas, o deslocamento e substituição de íons metálicos essenciais de biomoléculas, conformação, modificação, desnaturação e a ruptura da integridade de membranas celulares e organelares (Tomsett, 1993). Desta forma, a sobrevivência microbiana na presença de metais é dependente da disponibilidade e especiação dos metais assim como de intrínsecas propriedades estruturais, bioquímicas e de capacidade de adaptação fisiológica (Roane & Pepper, 2000).

3.3.10 Quantificação da degradação

A quantificação dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) foi realizada por meio de espectroscopia na região do infravermelho (IR), seguindo o método 418.1, padrão da agência de proteção ambiental americana (USEPA). Neste método os HTP são definidos como tudo que é extraído pelo solvente, que não seja removido na coluna de limpeza contendo material adsorvente, para retenção de possíveis hidrocarbonetos provenientes de fontes distintas do petróleo que possam ser detectados por IR. As principais vantagens deste método são a rapidez e o baixo custo.

Como verificado na figura 12 todos os tratamentos tiveram uma baixa degradação dos hidrocarbonetos. Em valores absolutos as maiores degradações ocorreram nos solos que foram inicialmente contaminados com $10.000 \text{ mg kg}^{-1}$. Contudo, percentualmente tais degradações foram inferiores a todos os solos contaminados com 2.000 mg kg^{-1} (Figura 13). Além disso, pode-se observar que independentemente das concentrações iniciais de hidrocarbonetos, as maiores degradações ocorreram nos tratamentos sem a presença de metais pesados, sendo que a menor degradação ocorreu na presença de cromo e cobre.

Tais resultados demonstram que a presença dos metais pesados suprimiu a degradação dos hidrocarbonetos, sendo que tal efeito foi observado e reportado por Nakatsu *et al.* (2005), Shen *et al.* (2005) e Atagana (2006).

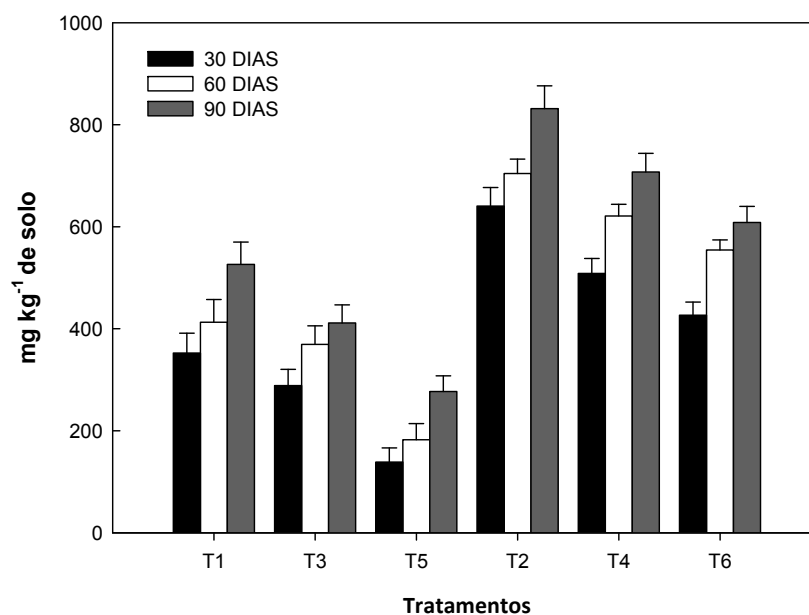


Figura 12. Valores absolutos da degradação dos hidrocarbonetos de petróleo no solo. Tratamentos com numeração ímpar tiveram contaminação inicial de HTP de 2.000 mg kg⁻¹ e numeração par de 10.000 mg kg⁻¹. As barras representam o erro padrão (p<0,05).

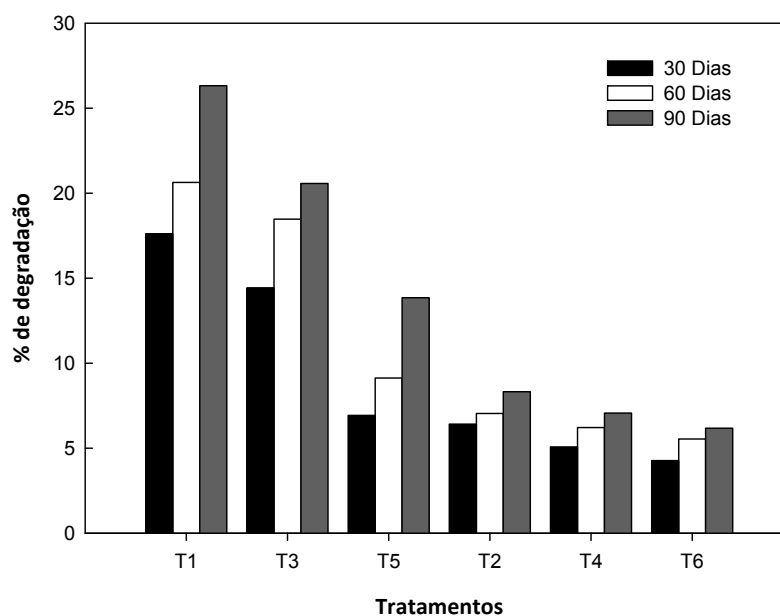


Figura 13. Porcentual de degradação dos hidrocarbonetos no solo.

As maiores degradações em valores absolutos, que foram visualizadas nos solos com maiores contaminações de hidrocarbonetos, provavelmente tenham ocorrido em função da maior abundância de hidrocarbonetos de cadeia aberta (alcanos), que são mais facilmente degradados pela microbiota do solo. Também são esperados que ocorram processos abióticos tais como fotodegradação, volatilização e complexação, que contribuam para os resultados da degradação (Fine et al, 1997).

No experimento verificou-se que as quantidades de hidrocarbonetos degradados detectados no IR foram superiores aos valores de carbono mineralizado, que é dado pela diferença de $C-CO_2$, entre o solo controle e os tratamentos (Figura 2). Desta forma, pode-se inferir que ocorreram perdas de hidrocarbonetos por processos abióticos. Provavelmente houve perdas na fração de parafinas voláteis (alcanos com cadeia < 10 carbonos) durante a manipulação dos microcosmos. Entretanto, acredita-se que as maiores perdas abióticas tenham ocorrido por interações físico-químicas dos hidrocarbonetos com a matriz do solo, principalmente com a fração orgânica estabilizada, impossibilitando a recuperação total dos hidrocarbonetos adicionados no solo, pelo método de extração. Por se tratar de um solo com textura predominantemente argilosa, apresenta predomínio de minerais com alta área superficial específica, que por sua vez confere grande capacidade de reatividade eletroquímica, proporcionando uma grande proteção da matéria orgânica (Sparks *et al.* 1995). Estas características físico-químicas, associadas à baixa disponibilidade de macronutrientes (essenciais ao metabolismo) e à reduzida biomassa microbiana, provavelmente foram os principais parâmetros envolvidos na baixa degradação ocorrida no experimento. Contudo, estes resultados são semelhantes aos obtidos por Caravaca & Roldán (2003), os quais observaram que a porcentagem de mineralização foi de apenas 6%, mediante biorremediação passiva, e atribuíram a baixa degradação à complexidade molecular dos hidrocarbonetos.

3.3.11 Alterações na diversidade bacteriana (DGGE)

O termo diversidade para a Biologia é geralmente utilizado para descrever o número de espécies presentes em um habitat. Em termos moleculares, a diversidade é

caracterizada pelo número de diferentes tipos de seqüências de DNA encontrados no ambiente (Liesack *et al.*, 1997). Em nosso experimento foram avaliadas as alterações da diversidade bacteriana ocorridas em função do tratamento aplicado ao solo, utilizando o gene RNAr 16S como marcador molecular, presentes somente em células procarióticas. As seqüências de DNAr 16S se tornaram padrão na determinação de relações filogenéticas, na avaliação da diversidade em amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (Head, 1998). A escolha do DNAr 16S decorre do fato deste apresentar todas as características necessárias a um marcador molecular ideal: possui uma distribuição universal, estrutura e função conservadas entre os *taxa* e um tamanho grande com informação suficiente que permite o estabelecimento de inferências filogenéticas robustas. Além disso, sua estrutura primária possui uma alternância entre regiões mais ou menos conservadas, permitindo a investigação de um espectro de distâncias filogenéticas, desde o nível de domínio até o nível de espécie (Ludwig & Schleifer, 1994). Por fim o grande número de seqüências de 16S rDNA disponíveis atualmente ($\approx$ 190 mil seqüências segundo o *Ribosomal Database Project-II* rdp.cme.msu.edu), favorece ainda mais o uso desse gene como marcador filogenético por permitir uma vasta gama de comparações.

Conforme a figura 14 pode-se verificar que os perfis de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE) se agruparam de distintas formas em função dos tratamentos. O agrupamento com maior similaridade, aproximadamente 91%, foi formado pelos tratamentos T1 e T3 (“cluster 1”). Na seqüência, ficaram agrupados o T2 e T4 (“cluster 2”) com cerca de 84% de similaridade. O terceiro cluster (“cluster 3”) foi formado pelo agrupamento dos “cluster 1” e “cluster 2”, com similaridade de aproximadamente 75%, sendo que este cluster se agrupou, com 68% de similaridade, com o tratamento T6 formando o “cluster 4”. Assim, verifica-se que a menor similaridade observada foi de 65% entre os “clusters 4 e 5”, sendo este último formado pelo solo controle e o T5, com similaridade de 70%. Analisando a formação dos “clusters” ficou evidente que todos os solos que receberam dosagens iguais de hidrocarbonetos, combinados ou não com cromo, foram aqueles que apresentaram as maiores similaridades (cluster 1 e cluster 2).

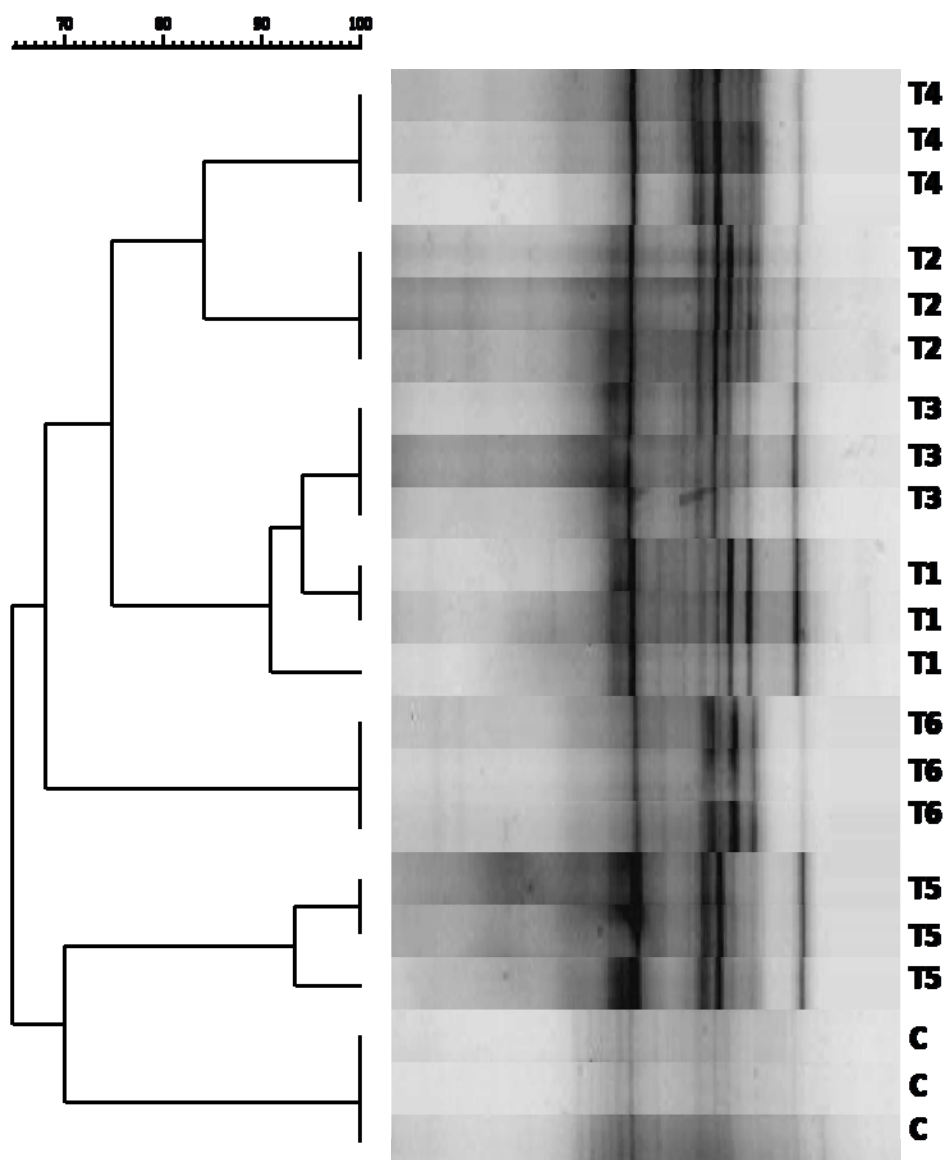


Figura 14. Análise de agrupamentos de perfis de DGGE de solos contaminados, após 90 dias de experimento. O “bootstrap” representa a similaridade entre os perfis. Análise realizada com o software GelCompare v.4.2 (Applied Maths, Bélgica).

Neste sentido, podemos inferir que a dosagem de hidrocarbonetos teve um efeito mais pronunciado do que o cromo, favorecendo populações específicas da microbiota capazes de tolerar e/degradar as concentrações de hidrocarbonetos. Por outro lado, os

tratamentos que combinaram hidrocarbonetos, cromo e cobre apresentaram níveis de similaridade muito baixos com relação aos demais tratamentos entre si ($\leq 70\%$). Estes dados sugerem que a combinação de hidrocarbonetos com os metais pesados cromo e cobre selecionaram populações distintas daquelas de outros tratamentos, capazes de tolerar o estresse proporcionado pelo efeito sinérgico dos contaminantes combinados. Além disso, a dosagem de hidrocarbonetos também influenciou a diferenciação das comunidades entre os tratamentos T5 e T6, os quais apresentaram $< 70\%$ de similaridade.

Em suma, a análise do DGGE mostrou que todos os solos contaminados sofreram grandes alterações em sua diversidade inicial, baseado no solo controle. A menor diferenciação ocorreu no tratamento T5, que apresentou uma alteração da comunidade bacteriana de aproximadamente 30%. Contudo, a alteração apresentada pelos demais solos contaminados foi de apenas 5% superior ao apresentado pelo T5, em relação ao solo controle. Desta maneira, todos os solos contaminados apresentaram uma similaridade de 65% ao final do experimento com o solo não contaminado, com exceção do solo T5 que foi 70%.

Podemos verificar que os solos contaminados com hidrocarbonetos e cromo se agruparam pela dosagem dos hidrocarbonetos, demonstrando que o cromo pouco influenciou na diferenciação da diversidade. Segundo Wang & Shen (1995), embora o Cr^{+6} possua grande efeito deletério sobre as células microbianas, no solo existem mecanismos bióticos e abióticos para a destoxificação. Um destes mecanismos é a redução do Cr^{+6} para Cr^{+3} , que pode ocorrer por reações químicas e/ ou reações enzimáticas, reduzindo consideravelmente a toxidez deste elemento. Quando foram combinados hidrocarbonetos, cromo e cobre, possivelmente mesmo com a redução do cromo a toxicidade do cobre prevaleceu, forçando a microbiota a grandes alterações fisiológicas selecionando os microrganismos mais aptos, que evidencia a maior diferenciação destes tratamentos. Assim, estes resultados estão de acordo com os reportados por Joynt *et al.* (2006), os quais analisaram as alterações da comunidade microbiana frente à contaminação de hidrocarbonetos de petróleo, chumbo e cromo. Estes concluíram que o efeito combinado destes contaminantes proporcionou uma grande alteração na

comunidade microbiana, contudo, não elucidaram o mecanismo associado a tais alterações sugerindo que estudos mais detalhados deveriam ser realizados.

Atualmente, existem inúmeros trabalhos que reportam às alterações nas comunidades microbianas em solos contaminados com hidrocarbonetos e metais pesados, utilizando DGGE. Com base na literatura internacional, utilizando-se o portal eletrônico do ISI web of science (acesso em 23/03/08) com idênticos critérios de busca, foram encontrados 34 trabalhos que avaliaram tais alterações em solos contaminados unicamente com hidrocarbonetos e 25 trabalhos realizados com solos contaminados com metais pesados, sendo encontrado apenas 5 trabalhos relacionados a avaliação do efeito combinado de hidrocarbonetos e metais pesados. De acordo com Shi *et al.* (2002), que avaliaram o efeito combinado de hidrocarbonetos e metais pesados, relataram que em solos sob estas condições, somente os microrganismos tolerantes a ambos agentes tóxicos estarão aptos a sobrevivência. Além disso, as alterações na estrutura das comunidades microbianas decorrentes destas condições ambientais, não são iguais aquelas promovidas em resposta a exposição à agentes tóxicos individuais. Por esta razão, a análise cruzada de resultados obtidos em experimentos com agentes tóxicos individuais e combinados pode acarretar em graves erros de interpretação. Isto ocorre em função dos efeitos sinérgicos e/ou antagônicos responsáveis pelas alterações na comunidade microbiana, e que não ocorrem na presença de agentes tóxicos individuais.

Diante disso, foram evitadas as comparações dos resultados obtidos no experimento com dados da literatura de solos contaminados com poluentes individuais, visando impedir possíveis interpretações errôneas na análise do DGGE.

3.4. CONCLUSÕES

- Hidrocarbonetos de petróleo combinados com os metais pesados cromo ou cromo mais cobre proporcionam um efeito sinérgico superior ao evidenciado para hidrocarbonetos, sobre a respiração microbiana que corresponde a uma maior taxa de liberação de C-CO₂;
- A biomassa microbiana é mais afetada negativamente por hidrocarbonetos quando estes estão combinados com os metais cromo ou cromo mais cobre;
- Existe um grande aumento na demanda energética celular para manter a biomassa microbiana frente à contaminação de hidrocarbonetos combinado com os metais pesados cromo ou cromo mais cobre;
- As atividades das enzimas desidrogenase, lipase, β -glucosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase do solo são inibidas pela presença de hidrocarbonetos combinados com os metais cromo ou cromo mais cobre;
- A população bacteriana heterotrófica do solo, cultivável *“in vitro”*, é reduzida diante da contaminação por hidrocarbonetos e/ou hidrocarbonetos combinados com os metais pesados cromo ou cromo mais cobre, sendo que a população de degradadores é aumentada na presença de hidrocarbonetos;
- A diversidade bacteriana do solo é afetada diferentemente de acordo com a dosagem de hidrocarbonetos, mesmo quando combinado com o metal pesado cromo. Entretanto, a combinação dos metais pesados cromo e cobre com dosagens distintas dos hidrocarbonetos tem um efeito mais pronunciado sobre a microbiota dos solos.

3.5 BIBLIOGRAFIA

ALEF, K. & NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. Ed. Academic Press, London, second printing, p.576. 1998.

ALLARD, A. S. & NEILSON, A. H. Bioremediation of organic waste sites: a critical review of microbiological aspects. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.39, p.253-285. 1997.

ANDERSON, J. P.E. Soil respiration, in A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeney (eds.), Agronomy Monograph Number 9: Part 2. **Chemical and Biological Properties**. Second edition. American Society of Agronomy and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA, p.831-871. 1982.

ANDERSON, T. H. Physiological analysis of microbial communities in soil: applications and limitations. In: Ritz, K., Dighton, J., Giller, K. E. (eds). **Beyond the biomass**. London: British Society of Soil Science, p.67-76. 1994.

ATAGANA, H. I. Biodegradation of polyacyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil by biostimulation and bioaugmentation in the presence of copper(II) ions. **World Journal Microbiology Biotechnology**. 2006.

BROOKES, P.C. Use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biology and Fertility of Soils**, v.19, p.269–279. 1995.

CARAVACA, F. & ROLDÁN, A. Assessing changes in physical and biological properties in a soil contaminated by oil sludges under semiarid Mediterranean conditions. **Geoderma**, v.117, p.53-61. 2003.

CECCANTI, B. *et al.* Soil Bioremediation: Combination of earthworms and compost for the ecological remediation of a hydrocarbon polluted soil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.177, p.383-397. 2006.

CONTIN, M. *et al.* **Indicatori biochimici di resilienza nell'inquinamento del suolo da petrolio**, Convegno annuale S.I.S.S. 2002.

COONEY, J. J. *et al.* Effects of organotins and organoleads on yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.4, p.279–288. 1989.

DEMANOU, J. *et al.* Structural and functional diversity of soil microbial communities as a result of combined applications of copper and mefenoxam. **Soil Biology & Biochemistry**, v.38, p.2381-2389. 2006.

FINE, P. *et al.* Soil interactions with petroleum hydrocarbons: abiotic processes. **Soil Technology**, v.10, p.133-153. 1997.

GADD, G. M. Interaction of fungi with toxic metals. **New Phytologist**, v.124, p.25–60. 1993.

GIANFREDA, L. *et al.* Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. **Science of the Total Environment**, v.341, p.265-279. 2005.

GILLER, K. E. *et al.* Toxicity of heavy metals to micro-organisms and microbial processes in agricultural soils: a review. **Soil Biology & Biochemistry**, v.30, p.1389-1414. 1998.

GORBUNOVA E. A. & TEREKHOVA B. A. Heavy metals as a stress factor towards fungi manifestation of their action on the cell and organism level. **Micologiya i phitopatologiya**, v.29, p.63–69. 1995.

HEAD, I. M. *et al.* Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, v.35, p.1–21. 1998.

HEUER, H. *et al.* Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.3233– 3241. 1997.

HINOJOSA, M. B. *et al.* Soil moisture pre-treatment effects on enzyme activities as indicators of heavy metal-contaminated and reclaimed soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.1559-1568. 2004.

JAEGER, K. E. *et al.* Bacterial Lipases. **FEMS Microbiological Reviews**, v.15, p.29-63. 1994.

JOYNT J. *et al.* Microbial Community Analysis of Soils Contaminated with Lead, Chromium and Petroleum Hydrocarbons. **Microbial Ecology**, v.51, n.2, p.209-219. 2006.

KIZILKAYA, R. *et al.* Microbiological characteristics of soils contaminated with heavy metals. **European Journal of Soil Biology**, v. 40, p.95-102. 2004.

KNIGHT, T. R. & DICK R. P. Differentiating microbial and stabilized β -glucosidase activity relative to soil quality. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.2089-2096. 2004.

LANDI, L. *et al.* Influence of cadmium on the metabolic quotient, L:D-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity: microbial biomass ratio under laboratory conditions. **Biology and Fertility Soils**, v.32, p.8-16. 2000.

LEAHY J. G. & COLWELL R. R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbiological Reviews**, v.54, n.3, p.305-315. 1990.

LEE, I. S. *et al.* Heavy Metal Concentrations and Enzyme Activities in Soil from a Contaminated Korean Shooting Range. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.94, p.406-411. 2002.

LIESACK, W. *et al.* Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: **Modern Soil Microbiology**. VAN ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. Marcel Dekker, Inc. New York, pp.712, 1997.

LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v.15, p.155-173. 1994.

LUGAUSKAS, A. *et al.* Effect of copper, zinc and lead acetates on microorganisms in soil. **Ekologija**, n.1, p.61-69. 2005.

MARGESIN, R. *et al.* A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil. **Biotechnology Letters**, v. 24, p.27-33. 2002.

MARGESIN, R. & SCHINNER, F. Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, p.462-468. 1997

MARGESIN, R. *et al.* Monitoring of bioremediation by soil biological activities. **Chemosphere**, v.40, p.339-346. 2000.

MARGESIN, R. *et al.* Soil lipase activity – a useful indicator of oil biodegradation. **Biotechnology Techniques**, v.13, p.859-863. 1999.

MARGESIN, R. *et al.* The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbon) on enzyme activities and microbial properties of soil. **Acta Biotechnologica**, v.20, p.313-333. 2000a.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Ed. UFLA, pp.626. 2002.

NAKATSU, C. H. *et al.* Soil Microbial Community Responses to Additions of Organic Carbon Substrates and Heavy Metals (Pb and Cr). **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.12, p.7679-7689. 2005.

NANNIPIERI, P.; KANDELER, E.; RUGGIERO, P. **Enzyme activity as monitors of soil microbial functional diversity**, in: Burns, R.G., Dick, R. (Eds.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, New York, p.234-251. 2002.

NEIDHARDT, I.C. *et al.* **Physiology of the bacterial cell**. Sinauer: Massachussetts, pp.506. 1990.

NIES, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.27, p.313-339. 2003.

NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p.730-750. 1999.

OLIVEIRA, V.M. *et al.* A ribosomal RNA gene intergenic spacer based PCR and DGGE fingerprinting method for the analysis of specific rhizobial communities in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v.64, p.366-379. 2006.

RENELLA G. *et al.* Functional activity and microbial community structure in soils amended with bimetallic sludges. **Soil Biology & Biochemistry**, v.37, p.1498–1506. 2005b.

RENELLA G. *et al.* Microbial activity and hydrolase synthesis in long-term Cd-contaminated soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v.37, p.133–139. 2005a.

RENELLA, G. *et al.* Effects of Cd, Zn, or both on soil microbial biomass and activity in a clay loam soil. **Biology and Fertility Soils**, v.43, p.751-758. 2007.

RIFFALDI, R. *et al.* Soil Biological Activities in Monitoring the Bioremediation of Diesel Oil-Contaminated Soil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.170, p.3-15. 2006.

ROANE T. M. & PEPPER I. L. Microbial responses to environmentally toxic cadmium. **Microbial Ecology**, v.38, p.358–364. 2000.

SANTOS, P. M. *et al.* Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. **Proteomics**, v.4, p.2640–2652. 2004.

SCHMITZ, J. A. K. **Indicadores biológicos de qualidade do solo**. 2003. 176 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

SHAW, W. H. R. & RAVAL, D. N. The inhibition of urease by metal ions at pH 8.9. **Journal of American Chemistry Society**, v.83, p.3184-3187. 1961.

SHEN G. Q. *et al.* Interaction of polycyclicaromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzyme. **Chemosphere**, v.61, p.1175-1182. 2006.

SHI, W. *et al.* Association of Microbial Community Composition and Activity with Lead, Chromium, and Hydrocarbon Contamination. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3859-3866. 2002.

SIKKEMA, J. *et al.* Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Review**, v.59, p.201-222. 1995.

SPARKS, D.L. **Environmental soil chemistry**. San Diego: Academic Press, pp.267. 1995.

SPARLING, G. P. & WEST, A. W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: calibration in situ using microbial respiration and ¹⁴C labelled cells. **Soil Biology and Biochemistry**, v.20, Issue 3, p.337-343. 1988.

STOTZKY, G. **Microbial Respiration**. In: BLACK, C. A. (ed.). Methods in soil analysis. Madison: SSSA, 1965. p.1550-1572.

TEDESCO, M.J. *et al.* **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 174p.

TOMSETT B. A. **Genetic and molecular biology of metal tolerance in fungi**. Stress tolerance in fungi (ed. D. H. Jennings). M. Decker, New York. p. 69–95. 1993.

VAN der WAARDE *et al.* **Enzyme assays as indicators for biodegradation**. In van den Brinck, W.J., Bosman, R. Arendt, F. (Eds.), Contaminated Soil 95. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.1377-1378. 1995.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C ; JENKINSON, D. S. *et al.* An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, n.6, p.703-707, 1987.

WANG J. *et al.* Effect of cadmium alone and in combination with butachlor on soil enzymes. **Environmental Geochemistry Health**, v.29, p.395-403. 2007.

WANG, Y. T. & SHEN, H. Bacterial reduction of hexavalent chromium. **Journal Industrial Microbiology**, v.14, p.159–163. 1995.

METAPROTEÔMICA DE UMA COMUNIDADE MICROBIANA EXPOSTA A FENOL E CROMO¹

Santos, E.C.^{2*}; Chicano, E.G.³; López-Barea, J.³; Durrant, L.R.²

²Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana/FEA/UNICAMP, Campinas, SP.

³Laboratório de Proteômica Ambiental/Universidade de Córdoba, Córdoba, Espanha.

*ederrs@fea.unicamp.br

RESUMO

Comunidades microbianas tais como as presentes em solos, formam sistemas extremamente complexos e dinâmicos em termos estruturais e funcionais. Portanto, pouco se conhece das alterações funcionais de comunidades microbianas expostas a contaminantes. Este estudo descreve uma avaliação metaproteômica para determinar os perfis de proteínas expressadas (metaproteomas) por uma comunidade microbiana proveniente de um solo sem histórico de contaminação, submetida a distintos tempos de exposição a fenol e cromo. Em média, foram detectados mais de 1500 spots bem resolvidos nos perfis metaproteômicos. As proteínas identificadas ficaram restritas a dois principais grupos funcionais: transportadoras e do metabolismo. Estas proteínas foram relacionadas diretamente a vários mecanismos de resposta ao estresse causado pela presença dos contaminantes. A avaliação metaproteômica conseguiu detectar a regulação diferencial de proteínas em um curto período de tempo de exposição aos contaminantes. Esta sensibilidade demonstra que metaproteômica é uma ferramenta robusta, que pode auxiliar muito no entendimento de novos mecanismos de resposta fisiológica a fatores de estresse.

Palavras chaves: Biomarcadores moleculares; proteômica ambiental; Fenol; cromo.

¹ Artigo em preparação para ser submetido à revista **Proteomics (F.I.= 5,76)**.

4.1. INTRODUÇÃO

A diversidade de organismos no solo é influenciada por inúmeras interações entre vários fatores físicos, químicos e ecológicos. Microrganismos pertencentes aos três grandes domínios filogenéticos, Archaea, Bacteria (ou Eubacteria) e Eukarya, habitam o solo de acordo com a disponibilidade e configuração dos nichos. Estas comunidades microbianas impactam nossas vidas de diferentes maneiras, incluindo saúde, agricultura e meio ambiente. São os principais responsáveis pela ciclagem dos resíduos orgânicos naturais e antrópicos, estando envolvidos diretamente nos principais ciclos biogeoquímicos do planeta. Assim, um melhor entendimento da ecologia microbiana pode conduzir a uma clara descrição de processos de patogenia, ciclagem de nutrientes e eliminação de resíduos tóxicos por processos de biodegradação. No entanto, a grande complexidade destas comunidades microbianas torna seus estudos um grande desafio.

Na atualidade, um grande número de ferramentas para exploração de comunidades microbianas tem surgido, das quais se destacam as baseadas na extração de mRNA (transcriptômica) e DNA (metagenômica). Estas técnicas baseadas no perfil de ácidos nucleicos são muito úteis para elucidar a estrutura de comunidades microbianas nos mais distintos ambientes terrestres e aquáticos, bem como em muitos ambientes extremos (salinas, fontes termais, drenagens ácidas, etc). Infelizmente, o conhecimento da estrutura de uma comunidade microbiana não fornece informação sobre sua complexidade funcional, tais como capacidade metabólica e de resposta fisiológica às variações nas condições ambientais.

Em contraste, análises metaproteômicas podem expor rápidas alterações fisiológicas, pois a síntese de proteínas é extremamente rápida e regula a transcrição de genes essenciais à sobrevivência dos microrganismos. Sob condições de estresse ambiental, os microrganismos são forçados a expressar proteínas específicas para aquisição da tolerância ou resistência. A identificação destas proteínas pode ser considerada como biomarcadores moleculares que podem ser empregados no monitoramento de processos biológicos como a biorremediação. A detecção de

modificações pós-traducionais são muito relevantes, porque muitas enzimas possuem suas bioatividades dependentes destas modificações, sendo que estas podem refletir as variações das condições ambientais. Alternativamente, uma vez estabelecidas as biomarcas, estas podem servir de “alvos” para análises de Western Blot. Desta forma, a metaproteômica pode fornecer informações que não estão disponíveis por qualquer outro método conhecido até o presente momento.

Dentro deste contexto, o objetivo do presente estudo foi empregar a metaproteômica para obter informações sobre a resposta dinâmica de uma comunidade microbiana, proveniente de um solo sem histórico de contaminação, mediante a exposição a fenol e cromo em distintos intervalos de tempo.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Coleta da amostra de solo

A amostra de solo foi coletada em um local sem histórico de contaminação dentro da área do Campus da Universidade de Huelva, localizada na comunidade autônoma da Andaluzia, Espanha (Figura 1).



Figura 1. Vista geral do estuário Domingo Rubio e imagem do local da coleta, dentro do campus da Universidade de Huelva.

Estas amostras foram coletadas em uma profundidade de 0-5 cm em vários pontos da área amostrada, formando uma amostra composta homogeneizada que posteriormente da qual foi retirada uma sub-amostra para a realização dos experimentos. Todo material coletado foi acondicionado em caixas térmicas com gelo até o seu processamento no laboratório.

4.2.2 Análises físico-químicas do solo

Após o processamento das amostras de solos, estas foram submetidas a análises físicas (granulometria), químicas (pH, carbono orgânico total, matéria orgânica, carbonatos, condutividade elétrica (CE) e potencial redox (Eh)) segundo métodos propostos por Tedesco et al (1995).

4.2.3 Montagem do experimento *in vitro*

Em frascos de erlenmeyer de 1000 mL contendo 300 mL de meio LB, foram adicionados 30 g de solo sem histórico de contaminação os quais foram submetidos à exposição a fenol, cromo (Cr^{6+}) e ambos combinados, sob distintos tempos de exposição (Figura 2).

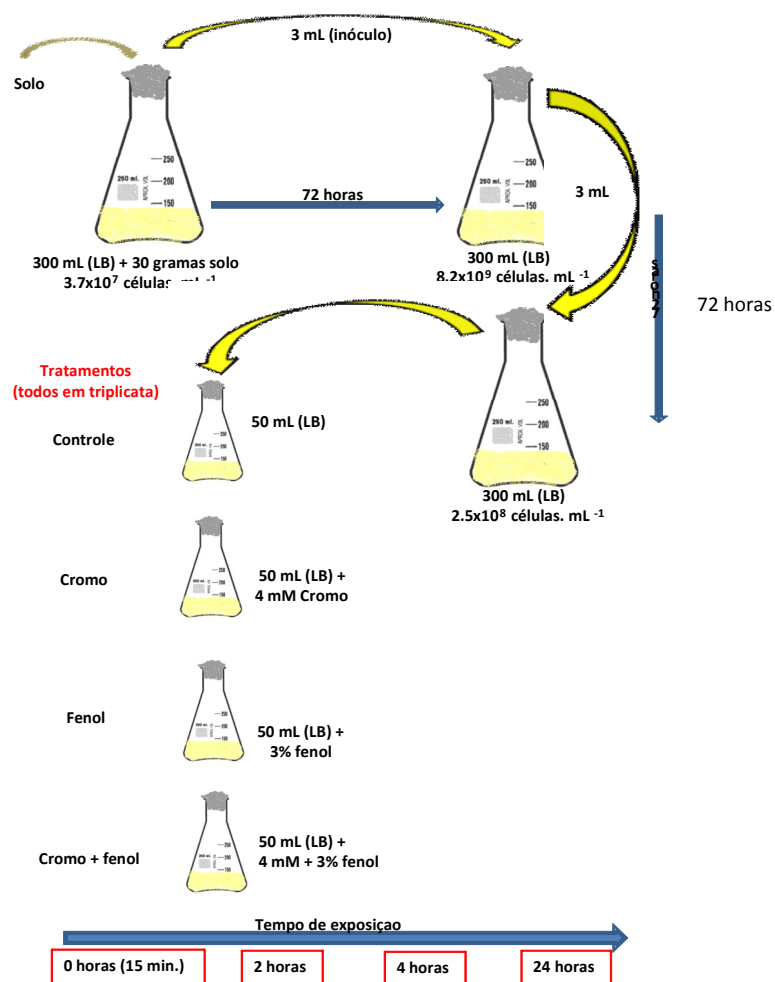


Figura 2. Fluxograma do experimento *in vitro*.

4.2.4 Contagem microbiana

A quantificação da população microbiana total, cultivável *in vitro*, foi determinada por contagem em placa do número de colônias, em meio agar nutriente.

4.2.5 Extração das proteínas *in vitro*

Para a extração das proteínas *in vitro*, observando-se os tempos de exposição, o volume total dos cultivos (50 mL) foi adicionado a tubos de centrifugas e submetidos à centrifugação a 20.000 rpm a 4 °C durante 15 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o pelete foi limpo. A limpeza foi realizada pela adição de 30 mL de uma solução contendo 3 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 68 mM NaCl e 68 mM NaH₂PO₄, sendo o conteúdo agitado em vortex por 10 seg e realizado nova centrifugação como descrito anteriormente. Para garantir uma boa limpeza este passo foi realizado 3 vezes.

Para a extração, foi adicionado ao pelete limpo 2 mL de uma solução extratora contendo 200 µL de inibidor de protease (Sigma P 2714), 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10% de sacarose, 2mM de dithiothreitol (DDT), 4 mM EDTA, 0,1% Brij 58 com o pH final ajustado para 7,58, sendo realizada a lise celular física por congelamento. Este procedimento foi realizado por imersões em nitrogênio líquido, sendo repetido este procedimento 4 vezes.

4.2.6 Quantificação das proteínas e armazenamento

A quantificação da concentração final das proteínas foi realizada pelo método da reação de Bradford (Bio-Rad) seguida da leitura espectrofotométrica a 595 nm. Após a quantificação os extratos protéicos foram separados em alíquotas de 500 µL e congelados em ultra freezer -80 °C, sendo mantidos sob estas condições até o momento das análises.

4.2.7 Concentração do extrato protéico

Com objetivo de concentrar as proteínas extraídas, o extrato protéico foi submetido a diferentes métodos de concentração. Os métodos utilizados foram: concentração por redução do volume por Speed Vac, precipitação mediante os métodos de adição de acetona, ácido tricloroacético e sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄).

4.2.8 Limpeza do extrato protéico

A limpeza das proteínas foi realizada pela separação em fases do material orgânico solúvel em fenol e pela utilização do Kit comercial 2D-Clean-Up® Amersham.

4.2.9 Análises proteômicas

Devido à alta sensibilidade das técnicas de espectrometria de massas, todas as fases que constam os estudos proteômicos se fizeram extremando as precauções necessárias para evitar a contaminação por queratina. Todo o material foi lavado antes de seu uso com água destilada e etanol. Foram utilizada luvas de procedimentos previamente lavadas com etanol.

4.2.10 Primeira dimensão (Isoelectric focusing –IEF)

A separação das proteínas por ponto isoeletrico (isoeletroenfoque) foi realizado pelo sistema Bio-Rad IEF (GE Healthcare), utilizando géis de IEF (IPG Strips) de 18 cm com pH imobilizado de 4-7. Para isso, alíquotas dos extratos protéicos foram adicionados a um tampão de reidratação (TR) (8 M uréia, CHAPS 2% peso/volume, 1% azul de bromofenol, 0,5% tampão IPG) em um volume correspondente à concentração final de 150 µg de proteínas, respeitando o volume final total de 350 µL (amostra+TR). A amostra foi incubada à temperatura ambiente por 30 min, sendo posteriormente centrifugada a 14000 rpm por 1 minuto. Em sequência, a amostra foi posta em contato com o gel de IEF na câmara de reidratação, que foi coberto com óleo mineral. Os géis de IEF foram submetidos a 6 h de reidratação passiva seguido de 6 h de reidratação ativa a 50 v, sendo na sequência 3 rampas lineares de 1,5 h de 500, 1000, 2000 v, respectivamente e, 2 rampas rápidas de 2 h de 4000 e 8000 v, sob temperatura de 20 °C durante todo o processo, retirando-se as tiras após a obtenção de 53000 vh.

4.2.11 Segunda dimensão (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante em SDS foi realizada no sistema Protean® plus Dodeca™ cell (Bio-Rad) para géis de 18 cm. Previamente à eletroforese, os géis de IEF foram equilibrados por 30 min sob fraca agitação em um

tampão contendo 50 mM de 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 1% azul de bromofenol, com adição de DTT (10 mg.mL^{-1} de tampão). Após ter sido equilibrado com DTT foi repetido o passo anterior, diferindo somente pela adição de iodoacetamida ao tampão de equilibrado (45 mg.mL^{-1} de tampão).

Os géis de IEF equilibrados foram colocados sobre os géis de acrilamida ((12,5%)-18x16x 0,1 cm), polimerizados no dia anterior ao uso, sendo posteriormente selados por agarose (0,5%) contendo azul de bromofenol.

A eletroforese foi realizada a 20 °C, sendo programado 2,5 W por gel por 5 min e 10 W por gel por aproximadamente 5,5 h.

4.2.12 Revelações dos géis

Após a fixação os géis foram revelados por meio de Sypro Ruby “overnight” (Bio-Rad).

4.2.13 Digitalização das imagens

Os géis revelados foram escaneados sob emissão de luz ultravioleta em um *scanner* Molecular Imager PharosFX® System (Bio-Rad). A resolução do escâner foi ajustada para 50 μm .

4.2.14 Armazenamento dos géis escaneados

Após a obtenção das imagens digitais os géis foram selados em filmes plásticos visando proteção contra danos mecânicos e contaminação, em câmara fria a 6 °C, até o momento da retirada dos spots.

4.2.15 Análise das imagens

As imagens digitalizadas foram analisadas utilizando-se os softwares PDQuest™ versão 8.1 (Bio-Rad) e ProteomWeaver™ versão 4.1 (Bio-Rad). A intensidade dos spots foi normalizada pelo método chamado “*Total Quantity in Valid Spots*”. Foram selecionados os spots (proteínas separadas na eletroforese bidimensional) cuja expressão foi considerada significativamente diferente entre os géis.

4.2.16 Excisão dos spots

A excisão dos spots selecionados foi realizada sem manipulação humana em braço robô no equipamento Investigator ProPic™ Genomic Solutions™ (Figura 3).



Figura 3. Braço robô utilizado para excisão dos spots selecionados.

4.2.17 Digestão e preparo dos spots para espectrometria de massas

A digestão e preparo dos spots selecionados foram realizados mediante um braço robô, em um equipamento Investigator ProGest™ Genomic Solutions™ (Figura 4) para evitar a mínima manipulação humana e assim diminuir o risco de contaminação das amostras. A digestão enzimática das proteínas foi realizada pela adição automática de 15 μL de uma solução de tripsina ($50 \text{ ng. } \mu\text{L}^{-1}$ em NH_4HCO_3 25 mM pH 8,2). Na sequência foi eliminada a tripsina residual, sendo adicionado NH_4HCO_3 20 mM. A extração dos

peptídeos da digestão foi realizada mediante 3 lavagens com acetonitrila/água (1/1, v.v⁻¹) TFA 0,25%, seguido por 3 lavagens com acetonitrila.



Figura 4. Braço robô utilizado para digestão e preparo das amostras para espectrometria de massas.

4.2.18 Espectrometria de massas

A análise de espectrometria de massas foi realizada utilizando o equipamento 4000 Q Trap[®] LC/MS/MS (Applied Biosystems). Os parâmetros do equipamento foram ajustados utilizando uma mistura de 5 peptídeos padrões (angiotensina I, substância P, e 3 peptídeos sintéticos com massas moleculares de 1578, 1911 e 2149 Da). A voltagem do spray foi de 0,85 kv e a temperatura do capilar foi ajustada para 110 °C. A amplitude da janela de isolamento de íon precursor foi de 3 unidades de massa e a energia de colisão

foi de 30% (valor ótimo para íons de carga dupla). A informação obtida de cada peptídeo estudado inclui um espectro de varredura completo e um espectro de fragmentos gerados ou espectro MS/MS.

4.2.19 Identificação das proteínas (Bioinformática)

Para a identificação das proteínas foi utilizado o programa PEAKS (Bioinformatics Solutions) e o programa de distribuição livre LutefiskXP (R.S.Johnson, <http://www.sourceforge.net>). Com os *tags* obtidos foi realizada uma busca por homologia (BLAST), utilizando-se o programa Fasta (<http://fasta.biotech.virginia.edu/>). As bases de dados utilizadas foram Swiss-Prot (European Bioinformatics Institute, Heidelberg, Alemanha) e GenBank (National Center for Biotechnology Information, WA, Estados Unidos). As buscas foram realizadas em toda a amplitude de massa molecular e ponto isoelétrico e com restrição aos domínios *Bacteria* e *Eucarya*.

A ontologia e as funções moleculares das proteínas identificadas foram realizadas utilizando os softwares UniProt (Universal Protein Resource, <http://beta.uniprot.org/>) e ExPASy (Expert Protein Analysis System, <http://www.expasy.ch/>).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Amostra do solo

O local para coleta do solo utilizado no experimento foi escolhido por estar localizado junto ao principal pólo petroquímico da Andaluzia e próximo do estuário Domingo Rubio, que recebe grandes quantidades de efluentes derivados da atividade de mineração de metais. Este solo apresenta as mesmas características físico-químicas e geomorfológicas daqueles encontrados nas áreas contaminadas, contudo, não apresenta histórico de contaminação por estar dentro da área experimental do campus da Universidade de Huelva. De acordo com as análises realizadas podemos classificar o solo como: textura arenosa, pH próximo a neutralidade, alto teor de matéria orgânica e um elevado teor de sais (Tabela 1).

Tabela 1. Análises físico-químicas do solo utilizado no experimento.

pH	CE	Eh	Granulometria			M.O
H ₂ O	mS	mV	AREIA	ARGILA	SILTE	(%)
6,4	29,6	163	63,21	7,22	29,57	3,79

Tais informações são de suma importância uma vez que regem a maior parte das interações reativas que podem ocorrer no solo, sendo imprescindíveis para a melhor adequação dos protocolos a serem empregados (Ogunseitan, 2006). Desta forma, é possível aperfeiçoar as condições analíticas para recuperação do conteúdo protéico intra e extracelular, porque tanto as células microbianas quanto a fração protéica liberada no ambiente pela microbiota pode interagir com a fração mineral e orgânica da matriz do solo (Schulze, 2005).

A amostra de solo utilizada no experimento apresentou baixa capacidade de troca de cátions, devido ao predomínio de minerais na fração areia, que confere baixa reatividade eletroquímica pela limitada presença de cargas permanentes. Em contra partida, apresentou alto teor de matéria orgânica que possui grande potencial reativo

pela presença de cargas dependentes do pH (Sparks, 1995), e por esta razão foram realizados ajustes de força iônica no tampão de extração.

4.3.2 Contagem microbiana

As contagens microbianas (microrganismos cultiváveis) foram realizadas ao longo do experimento visando verificar o efeito tóxico imposto pelos contaminantes sobre o crescimento celular.

Para a surpresa durante todo o período do experimento, não ocorreram alterações significativas em nenhum dos tratamentos. Tais resultados são contraditórios aos obtidos por Lacerda et al. (2007), os quais observaram reduções na população microbiana, em relação ao controle, 3 h após a exposição a 0,09 mM de Cd (cádmio).

Tabela 2. Contagem microbiana de exposição a distintos contaminantes.

Tratamento	Tempos de exposição			
	0 h	2 h	4 h	24 h
Controle	7,4x10 ⁸	7,5 x10 ⁸	5,3 x10 ⁸	2,1 x10 ⁸
Fenol	4,7 x10 ⁸	3,5 x10 ⁸	3,6 x10 ⁸	8,8 x10 ⁸
Cromo	4,0 x10 ⁸	3,8 x10 ⁸	4,4 x10 ⁸	2,2 x10 ⁸
Fenol+cromo	2,9 x10 ⁸	3,2 x10 ⁸	3,6 x10 ⁸	3,3 x10 ⁸

Os resultados são as médias de triplicatas.

Com base nos resultados obtidos (Tabela 2) poderíamos sugerir que não houve efeito tóxico para a microbiota exposta aos distintos contaminantes, durante o período avaliado.

Embora a contagem de células viáveis seja uma técnica amplamente utilizada em análises de toxicidade microbiana esta possui baixa sensibilidade, uma vez que somente poderão ser distinguidos efeitos tóxicos agudos que resultem em uma rápida alteração da população microbiana causada pela morte dos indivíduos. Assim sendo, este conhecimento é muito superficial para gerar informações precisas sobre a capacidade metabólica e de respostas fisiológicas de organismos vivos, sob alterações ambientais

decorrentes da presença de poluentes. Bioquimicamente se supõe que tão logo os microrganismos sejam expostos a agentes que possam comprometer sua sobrevivência, uma série de reações fisiológicas são acionadas visando à proteção celular. Todo e qualquer mecanismo de resposta fisiológica, se presente, estará codificado em moléculas de DNA cromossomal e/ ou extracromossomal (plasmídeos) e a decodificação destas informações resultará em proteínas como produto final (Nies, 2000).

A síntese de proteínas, quando requisitada, é acionada em frações de segundos superando em muitas vezes a velocidade da dinâmica populacional mensurada por técnicas de contagens.

Com o advento de técnicas de transcriptômica, que podem analisar qualitativamente e quantitativamente cópias de mRNA (ácido ribonucléico mensageiro) transcritos durante processos celulares, houve um grande avanço no entendimento de processos metabólicos complexos (Valenzuela et al., 2006; Lacerda et al., 2007). No entanto, a presença de cópias de mRNA em células não pode garantir que as proteínas correspondentes serão sintetizadas, provocando uma grande restrição nestas técnicas. Em contraste, análises proteômicas podem revelar todas as alterações fisiológicas que as células estão sofrendo em uma determinada situação, gerando informações indisponíveis por qualquer outra técnica desenvolvida até o momento (Lacerda et al., 2007).

4.3.3 Análise da expressão das proteínas

As análises de imagens dos géis bi-dimensionais (2D-PAGE), dos diferentes tratamentos, foram realizadas utilizando-se duas ferramentas analíticas de bioinformática. O software PDquest® (Bio-Rad) foi utilizado para as análises qualitativas enquanto para as análises quantitativas foi utilizado o ProteomWeaver® (Bio-Rad).

As análises qualitativas dizem respeito quanto à sobre-expressão ou repressão de determinadas proteínas ao longo do experimento. Já as análises quantitativas possuem a sensibilidade de verificar alterações significativas das proteínas expressadas durante todo o experimento. Todas as análises foram delineadas para verificar as alterações ocorridas

em função do tempo de exposição aos contaminantes, sendo todos os tratamentos normalizados contra o controle.

4.3.3.1 Análise qualitativa e quantitativa da exposição a cromo

Atráves das análises de imagens dos géis referentes à exposição a cromo foi possível detectar mais de 1700 spots bem resolvidos, ao longo do tempo de exposição.

A primeira verificação metaproteômica, realizada aos 15 min de exposição a cromo, revelou uma sobre-expressão de proteínas de 5,81% em relação ao número total de proteínas detectadas (Tabela 3). Esta porcentagem representou a maior sobre-expressão que ocorreu durante todo experimento, totalizando 103 proteínas. A partir de 2 h de exposição a cromo, o número de proteínas sobre-expressadas começou a diminuir acentuadamente alcançando o menor índice 24 h após o início. Efeito inverso foi verificado com relação à repressão, a qual inicialmente foi baixa (0,9%) nos primeiros instantes, sendo que o maior número de proteínas reprimidas chegou a 70, na última verificação. No total, houve uma alteração qualitativa no perfil metaproteômico de 396 proteínas, que representam aproximadamente 22%.

Estes resultados sugerem que o cromo teve efeitos ambos estimulatório e inibitório, como anteriormente revelados por Stuczynski et al (2003).

Tabela 3. Proteínas expressadas e/ou reprimidas frente à exposição a cromo.

Tempo	Repressão	Sobre-expressão	NTPD
0 h (15min)	16 (0,90)	103 (5,81)	1774
2 h	44 (2,59)	74 (4,36)	1696
4 h	68 (3,88)	11 (0,63)	1753
24 h	70 (3,93)	10 (0,56)	1781

NTPD=número total de proteínas detectadas; Os valores entre parênteses representam a porcentagem em relação ao número total de proteínas detectadas.

Quantitativamente houve uma alteração em 50 proteínas, ou seja, estas tiveram sua quantidade significativamente alterada durante o experimento, sendo que estas mudanças ocorreram em 20, 8 e 22 proteínas e, em 2, 4 e 24 h respectivamente. Desta forma, podemos apontar uma alteração total no perfil metaproteômico de 446 proteínas entre análises qualitativas e quantitativas.

4.3.3.2 Análise qualitativa e quantitativa da exposição a fenol

Frente à exposição a fenol verificou-se que poucas proteínas foram sobre-expressadas nos primeiros 15 min, sendo que o número de proteínas reprimidas neste momento superou em aproximadamente 62% as sobre-expressadas (Tabela 4). A repressão teve uma tendência crescente até 4 h, havendo uma drástica redução no número de proteínas reprimidas na verificação de 24 h.

Tabela 4. Proteínas expressadas e/ou reprimidas frente à exposição a fenol.

Tempo	Repressão	Sobre-expressão	NTPD
0 h (15min)	69 (4,80)	26 (1,81)	1437
2 h	103 (7,14)	0 (0)	1443
4 h	127 (8,53)	5 (0,34)	1489
24 h	2 (0,12)	256 (14,81)	1728

NTPD=número total de proteínas detectadas; Os valores entre parênteses representam a porcentagem em relação ao número total de proteínas detectadas.

Entretanto, a contaminação com fenol foi responsável por uma enorme sobre-expressão visualizada com 24 h de exposição, que representou uma alteração no perfil metaproteômico de 256 novas proteínas, de um total de 588 qualitativamente alteradas. Este resultado representa uma alteração de 88,5% do total das proteínas sobre-expressadas, somente nesta verificação.

As análises quantitativas apontaram alterações em 63 proteínas, que corresponderam à alteração em 6, 11 e 46 proteínas em 2, 4 e 24 h respectivamente.

Embora, tenham sido observadas inibições e estimulações na síntese de proteínas, podemos averiguar que o fenol teve um efeito mais acentuado na sobre-expressão, no final do experimento.

4.3.3.3 Análise qualitativa e quantitativa da exposição a fenol+cromo

Quando os microrganismos foram expostos a fenol e cromo simultaneamente, nos primeiros 15 min observou-se uma pequena repressão e uma considerável sobre-expressão de proteínas (Tabela 5). A maior mudança no perfil metaproteômico ocorreu 24 h após o início do experimento, a qual foi verificada uma repressão de 177 proteínas (11,07%), momento este em que não foi constatada nenhuma sobre-expressão. As análises qualitativas mostraram alterações em 494 proteínas, contudo, sob o efeito combinado do fenol e cromo pode-se constatar que a tendência na expressão gênica se aproximou a dos microrganismos expostos ao cromo. É provável que o efeito tóxico do cromo acione rapidamente uma série de mecanismos fisiológicos representados pelas proteínas sobre-expressadas. As análises quantitativas apontaram alterações em 28 proteínas, que corresponderam à alteração em 16, 11 e 1 proteínas em 2, 4 e 24 h respectivamente.

Tabela 5. Proteínas expressadas e/ou reprimidas frente à exposição a fenol+cromo.

Tempo	Repressão	Sobre-expressão	NTPD
0 h (15min)	8 (0,52)	98 (6,33)	1548
2 h	46 (2,94)	48 (3,07)	1563
4 h	16 (1,07)	101 (6,76)	1493
24 h	177 (11,07)	0 (0)	1597

NTPD=número total de proteínas detectadas; Os valores entre parênteses representam a porcentagem em relação ao número total de proteínas detectadas.

4.3.4 Escolha e identificação das proteínas

A análise de todas as proteínas diferenciais no perfil metaproteômico, foi inviável devido ao elevado custo analítico para identificação de cada proteína. Deste modo, os

critérios de seleção adotados para a escolha das proteínas a serem identificadas por espectrometria de massas foram os seguintes: Intensidade do spot (spot = mancha no gel); baixo desvio padrão (pouca variação dos spots entre os géis); repetibilidade (o spot deveria estar presente em 100% das repetições); representatividade (spots de todos os tratamentos), com base nos resultados da análise de bioinformática.

Assim, com base nos critérios adotados foram selecionados 15 spots entre todos os tratamentos de exposição aos contaminantes. É coerente mencionar que cada spot pode conter mais de uma proteína, isto pode ocorrer devido à presença de isoformas e/ ou por modificações pós-traducionais, que podem alterar a massa relativa e o ponto isoelétrico da molécula (Aebersold & Mann, 2003). O tratamento que teve o maior número de spots selecionados foi o de exposição a cromo, o qual foram retirados 9 spots para identificação (Tabela 6 e Figuras 5 e 6). Nos tratamentos de exposição a fenol e a fenol+cromo foram selecionados 4 e 2 spots respectivamente (Tabelas 6 e 7 e Figuras 7 a 11).

Após a seleção, os spots dos géis em triplicata foram digeridos para comporem uma mistura de peptídeos e então serem submetidos à espectrometria de massas. A partir dos espectros obtidos na análise por MALDI-TOF foi decidido realizar análises no capLC- μ ESI-ITMS/MS. Os espectros de MS/MS obtidos foram submetidos ao software de busca SEQUEST. Para a identificação das proteínas foi criada uma base de dados para bactérias a partir de dados FASTA disponíveis no UniProt. As amostras que não foram identificadas mediante a busca na base de dados foram seqüenciadas “*de novo*” e cada *tag* seqüência foi analisado pelo software PEAKS e verificada a homologia da seqüência mediante MS-BLAST.

Todos esses procedimentos foram realizados para se obter identificação confiável das proteínas, uma vez que peptídeos de organismos de genoma desconhecido (não seqüenciados) somente são identificados se este compartilhar uma identidade de seqüência elevada com respeito a alguma das proteínas reportadas nas bases de dados.

Além disso, para garantir a identificação evitando-se resultados falso-positivos foram adotados os seguintes critérios: análise da correlação cruzada (Xc) e correlação normalizada (ΔC_n).

Tabela 6. Parâmetros analíticos dos spots selecionados no tratamento de exposição a cromo.

NSP	Mr	pI	Intensidades dos spots			DP
5801	60.16	5.83	375.6	364	370.5	5.81
8304	22.30	6.69	2007.6	1899	1820.6	93.90
8402	22.72	6.74	3860.8	3951	3696.1	129.25
8403	23.51	6.78	419.6	398.6	438.1	19.76
8404	24.70	6.79	768.2	790.6	829.5	31.01
8405	24.00	6.90	378.3	358.7	380.7	12.06
8406	23.05	6.69	327.4	301.4	318	13.16
8505	25.73	6.70	1081.8	1065.5	1013.1	35.89
8603	35.34	6.72	1025.7	1023	1006.2	10.56

NSP=número do spot (gerado pelo software); **Mr**=massa relativa; **pI**=ponto isoelétrico; **DP**=Desvio padrão.

Tabela 7. Parâmetros analíticos dos spots selecionados no tratamento de exposição a fenol.

NSP	Mr	pI	Intensidades dos spots			DP
0005	21.34	4.59	3066.1	3070.4	3133.7	37.85
1004	21.06	4.82	1391.3	1417.5	1392.5	14.79
5902	56.75	5.99	1307.3	1396.1	1332.7	45.74
5903	54.49	5.98	630.9	680.0	600.7	40.02

NSP=número do spot (gerado pelo software); **Mr**=massa relativa; **pI**=ponto isoelétrico; **DP**=Desvio padrão.

Tabela 8. Parâmetros analíticos dos spots selecionados no tratamento de exposição a fenol+cromo.

NSP	Mr	pI	Intensidades dos spots			DP
7602	42.06	6.32	1756.9	1646.2	1762.2	65.50
8503	27.89	6.75	2980.9	2908.5	2914.1	40.28

NSP=número do spot (gerado pelo software); **Mr**=massa relativa; **pI**=ponto isoelétrico; **DP**=Desvio padrão.

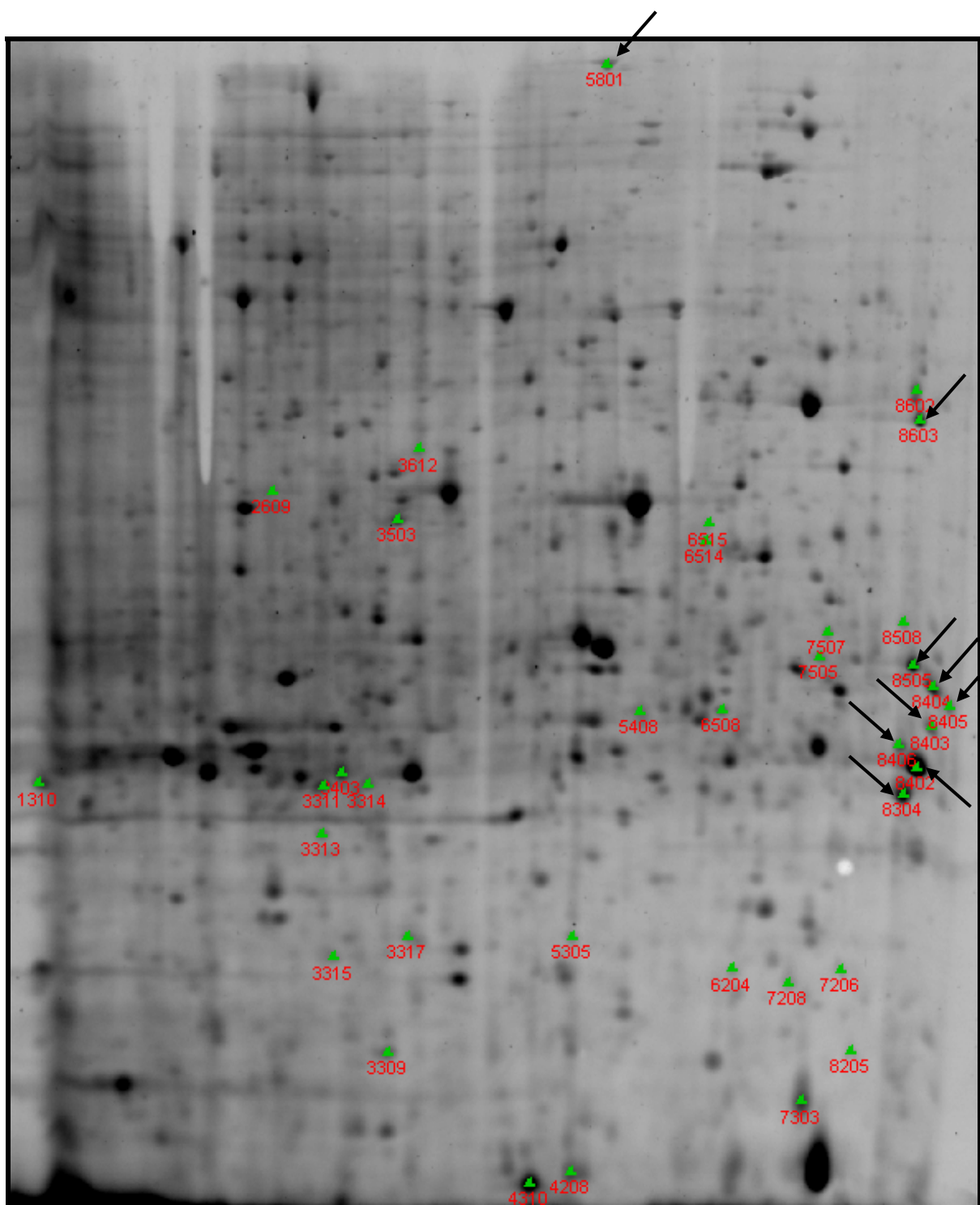


Figura 5. Detalhe dos spots selecionados no tratamento de exposição a cromo. As setas indicam o local de cada spot selecionado no gel 2D-PAGE.

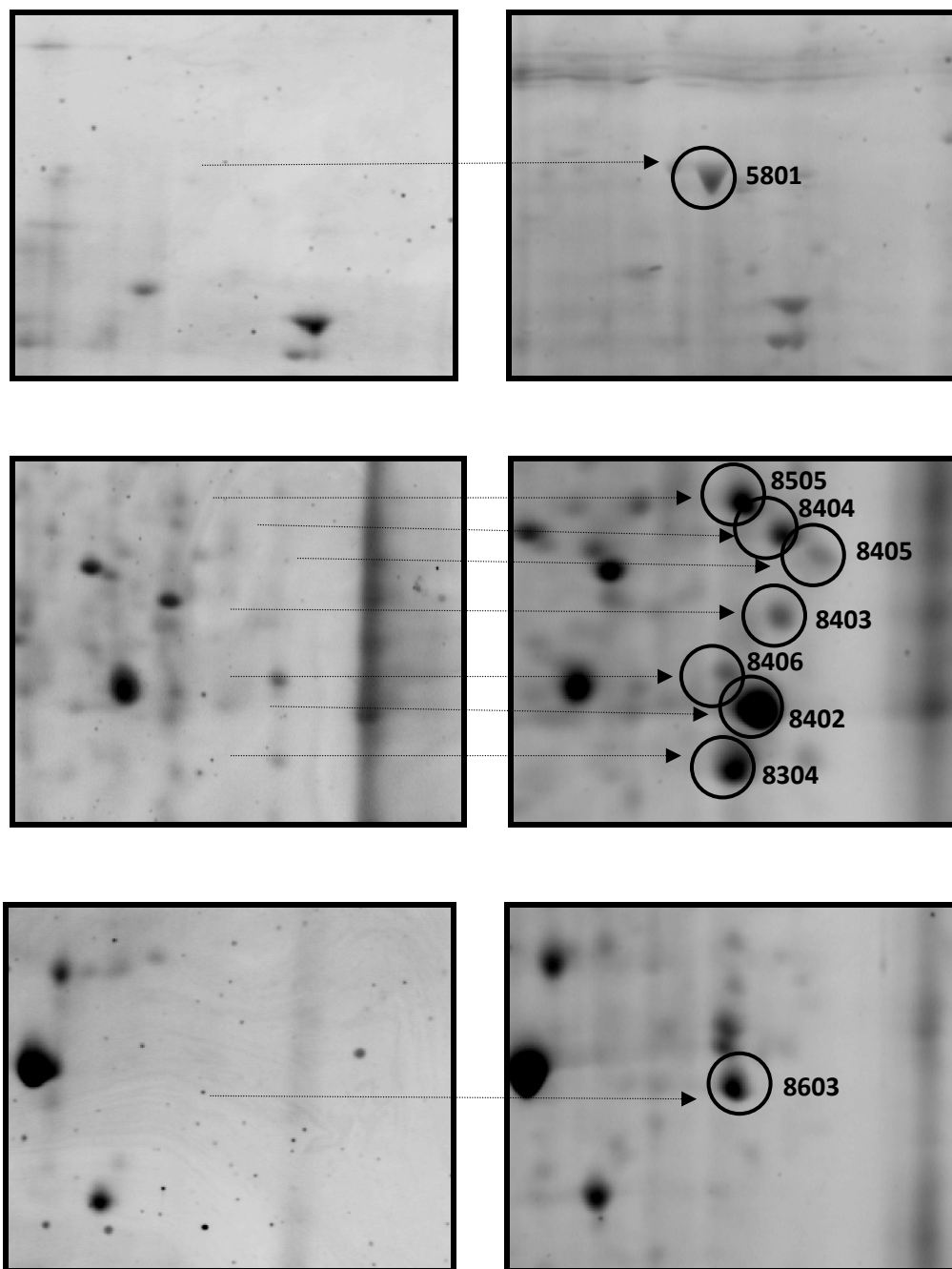


Figura 6. Detalhes dos spots selecionados no tratamento de exposição a cromo. A figura da esquerda representa a região no gel (controle) onde deveria estar o spot, e a figura da direita mostra a região do gel onde o spot foi localizado.

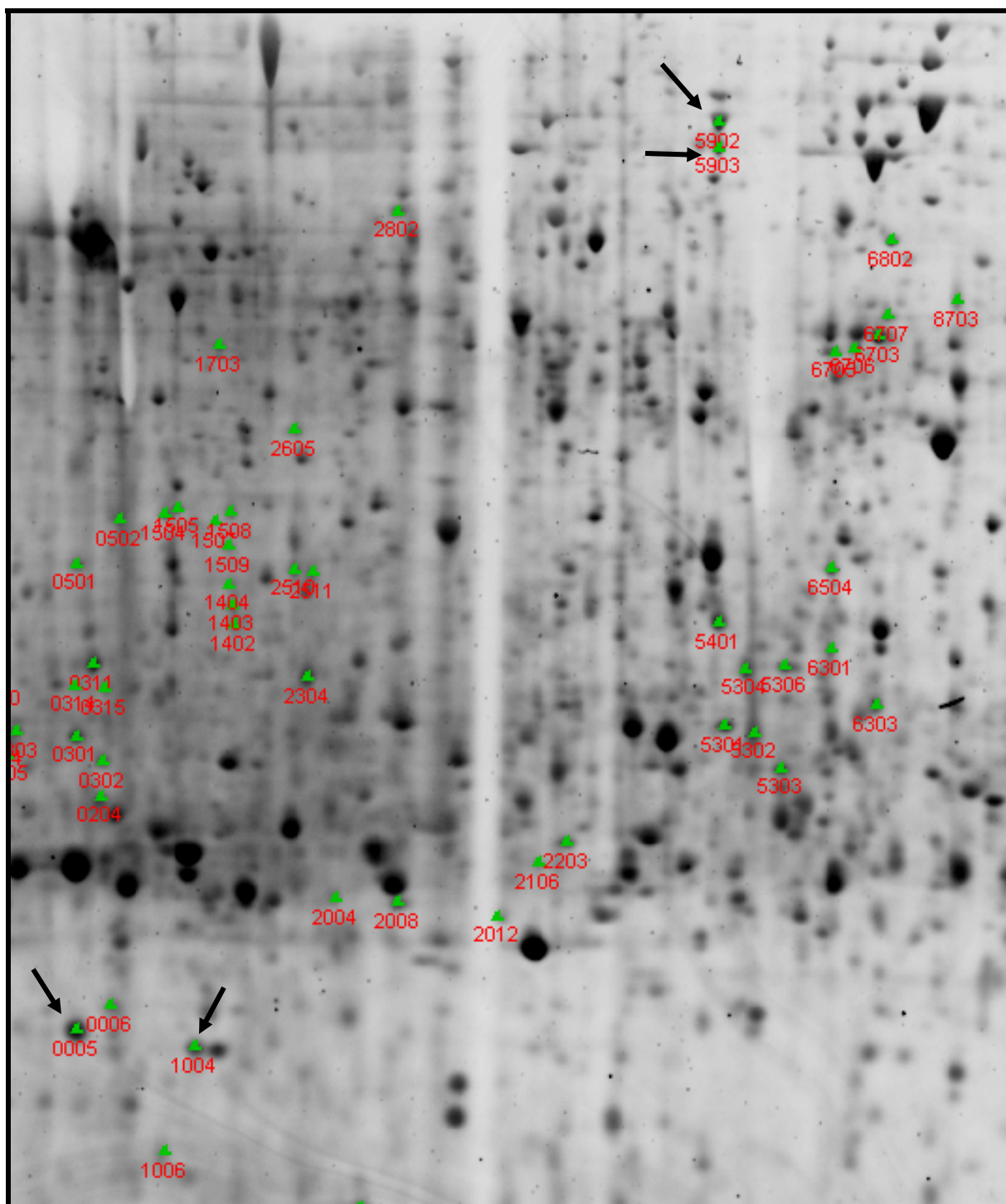


Figura 7. Detalhe dos spots selecionados no tratamento de exposição a fenol. As setas indicam o local de cada spot selecionado no gel 2D-PAGE.

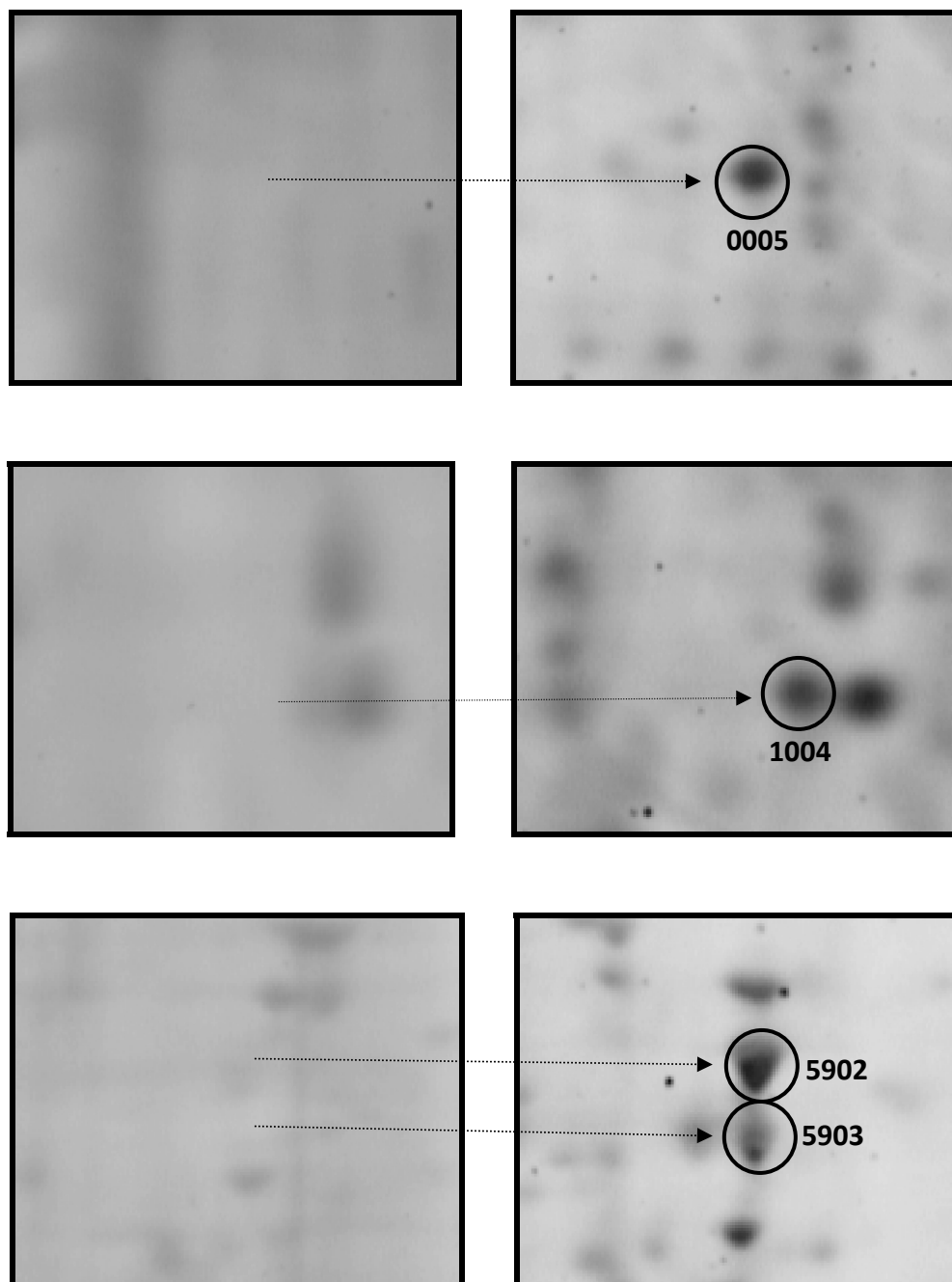


Figura 8. Detalhes dos spots selecionados no tratamento de exposição a fenol. A figura da esquerda representa a região no gel (controle) onde deveria estar o spot, e a figura da direita mostra a região do gel onde o spot foi localizado.

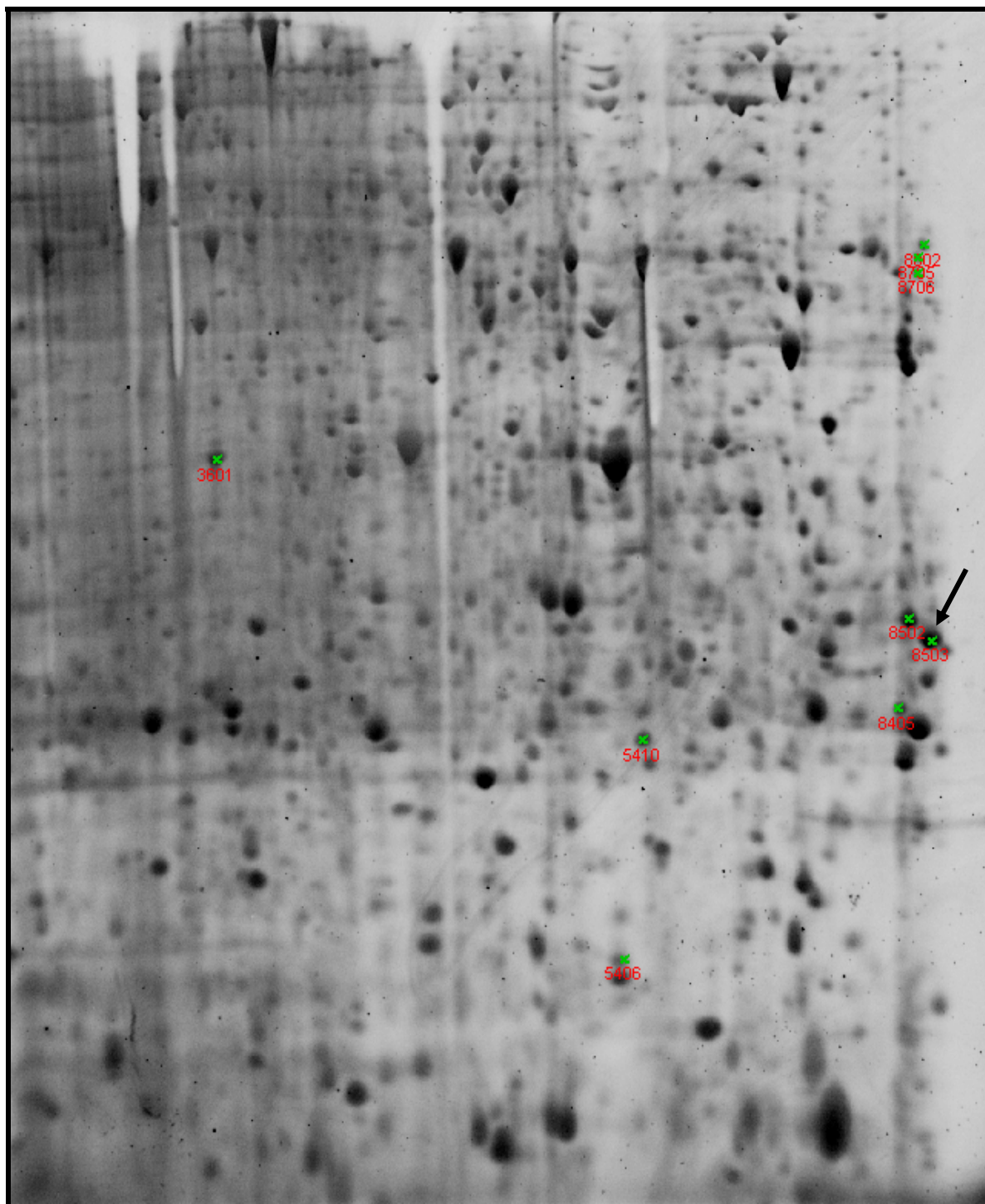


Figura 9. Detalhe do spot selecionado no tratamento de exposição a fenol+cromo .

A seta indica o local do spot selecionado no gel 2D-PAGE.

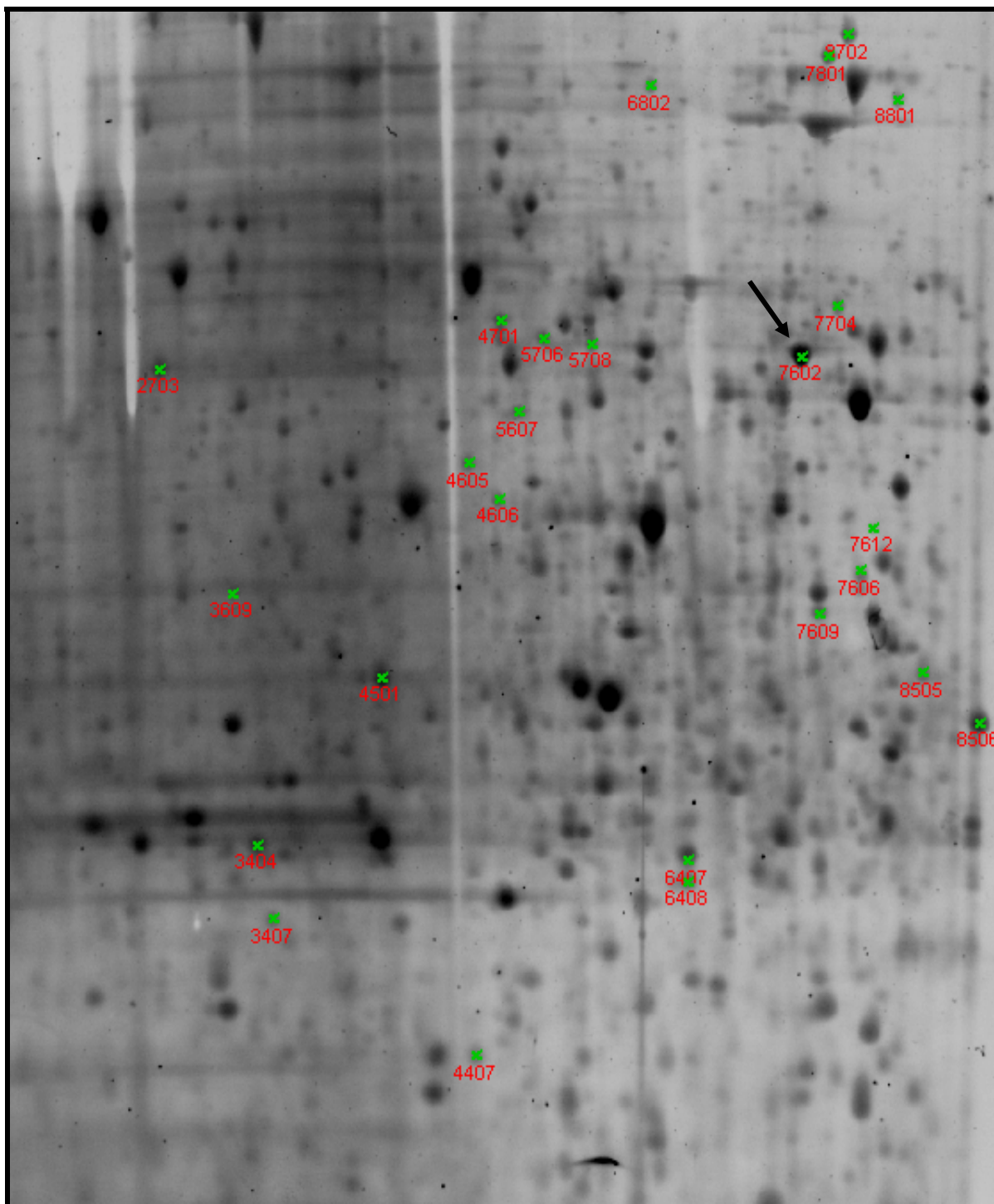


Figura 10. Detalhe do spot selecionado no tratamento de exposição a fenol+cromo .

A seta indica o local do spot selecionado no gel 2D-PAGE.

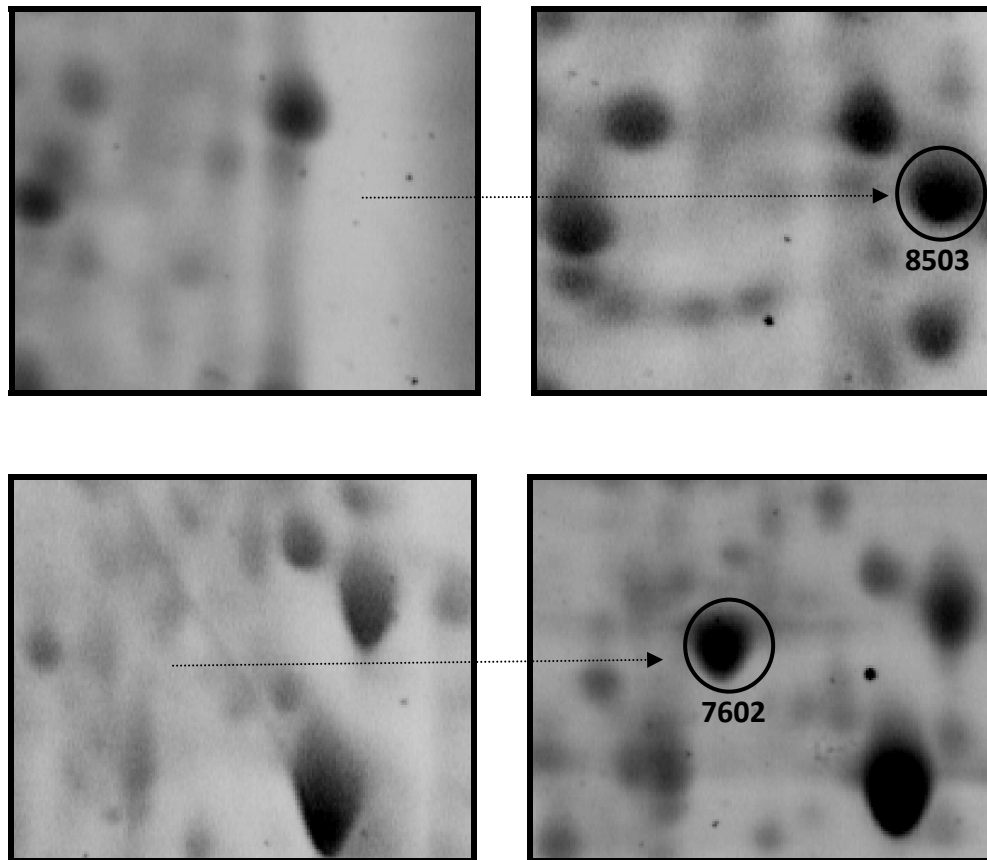


Figura 11. Detalhes dos spots selecionados do tratamento de exposição a fenol. A figura da esquerda representa a região no gel (controle) onde deveria estar o spot, e a figura da direita mostra a região do gel onde o spot foi localizado.

O Xc tem função de mensurar a similaridade da relação massa-carga (m/z) de fragmentos entre o valor predito de seqüências de amino ácidos publicados e o valor observado dos espectros de MS/MS. Já o ΔCn discrimina a alta qualidade do espectro mesmo quando este tenha sido ajustado a espectro teórico (Chao, et al., 2004). Como regra geral, valores maiores que 2,0 para Xc e 0,1 para ΔCn garantem uma análise de alta qualidade (Tabb et al., 2002), e assim, somente os resultados enquadrados dentro destes parâmetros foram considerados como identificação positiva. As proteínas identificadas por seqüenciamento “*de novo*” foram identificadas mediante homologia acima de 95% com o BLAST. Com base nestes critérios foram identificadas proteínas correspondentes a 6 spots do tratamento de exposição a cromo (Tabela 9).

Tabela 9. Proteínas identificadas do tratamento de exposição a cromo.

Spot	Peptídeo	MH+	XC	ΔCn	Proteína
5801	R.GTEDDKNGIVVALYAM*K.V	1839.92	3.50	0.2	Q48M80 Q48M80_PSE14 Putative tabtoxinine-beta-lactam limiting dipeptidase - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola
5801	K.YTGHTDNEFK.T	1211.53	2.48	0.3	Q48M80 Q48M80_PSE14 Putative tabtoxinine-beta-lactam limiting dipeptidase - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola
8304	K.GMGEGGAIAPPAVLFAVN DALRGLGA AELSR.T	3094.61	4.43	0.2	Q7WQP9 Q7WQP9_BORBR Oxidoreductase, large chain. - <i>Bordetella bronchiseptica</i>
8402	K.AQAYQITGVPTM*VVNGK.Y	1792.93	5.61	0.3	Q4KKJ6 Q4KKJ6_PSEF5 Thiol:disulfide interchange protein, DsbA family. - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8402	K.KAQAYQITGVPTM*VVNGK. Y	1921.02	4.12	0.4	Q4KKJ6 Q4KKJ6_PSEF5 Thiol:disulfide interchange protein, DsbA family. - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8402	K.FLSTYNFAVK.G	1276.66	3.13	0.2	Q4KKJ6 Q4KKJ6_PSEF5 Thiol:disulfide interchange protein, DsbA family. - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8402	R.FDLGTAGGPEGALSVADQLI AK.E	2130.11	5.77	0.6	Q4KKJ6 Q4KKJ6_PSEF5 Thiol:disulfide interchange protein, DsbA family. - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8404	K.SVM*DSGGLVSDDLINLVK.E	1991.04	5.35	0.5	Q4KHK4 Q4KHK4_PSEF5 Adenylate kinase - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8404	K.IAGKDDITGEDLVQR.K	1629.84	5.12	0.2	Q4KHK4 Q4KHK4_PSEF5 Adenylate kinase - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8404	K.FGIPQISTGDM*LR.A	1450.74	2.58	0.1	Q4KHK4 Q4KHK4_PSEF5 Adenylate kinase - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8505	R.EVLAPLGAQIKPYGSQNEIYL DVAAGR.L	2872.52	5.64	0.1	Q4K828 Q4K828_PSEF5 Arginine/ornithine ABC transporter, periplasmic arginine/orn - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8505	R.LDGTVADATLLNDGFLK.T	1762.92	5.19	0.4	Q4K828 Q4K828_PSEF5 Arginine/ornithine ABC transporter, periplasmic arginine/orn - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8505	K.PYGSQNEIYLDVAAGR.L	1752.86	4.59	0.4	Q4K828 Q4K828_PSEF5 Arginine/ornithine ABC transporter, periplasmic arginine/orn - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8505	K.IDAILSSM*SITDDR.K	1552.75	3.77	0.2	Q48G10 Q48G10_PSE14 Arginine/ornithine

...Continuação da tabela 9.

					ABC transporter, periplasmic arginine/orn - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola
8505	K.IGIEAAYPPFASK.A	1363.73	3.54	0.4	Q48G10 Q48G10_PSE14 Arginine/ornithine ABC transporter, periplasmic arginine/orn - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola
8505	K.YFDFDIYGK.-	1167.54	3.24	0.2	Q48G10 Q48G10_PSE14 Arginine/ornithine ABC transporter, periplasmic arginine/orn - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola
8505	K.IDAILSSM*SITDDRK.K	1680.85	3.03	0.3	Q48G10 Q48G10_PSE14 Arginine/ornithine ABC transporter, periplasmic arginine/orn - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. phaseolicola
8603	K.ATGIKPVYDVFDNETLEGK.L	2183.09	5.13	0.5	Q4K450 Q4K450_PSEF5 Putrescine ABC transporter, periplasmic putrescine-binding p - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8603	K.PVYDVFDNETLEGK.L	1712.80	3.36	0.4	Q4K450 Q4K450_PSEF5 Putrescine ABC transporter, periplasmic putrescine-binding p - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8603	K.GVNIAYAIPK.E	1045.60	3.24	0.2	Q4K450 Q4K450_PSEF5 Putrescine ABC transporter, periplasmic putrescine-binding p - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8603	R.TGYDVVVPSNHFLGK.Q	1632.84	2.79	0.3	Q4K450 Q4K450_PSEF5 Putrescine ABC transporter, periplasmic putrescine-binding p - <i>Pseudomonas fluorescens</i>

MH+=valores de dipeptídeos; **XC**= correlação cruzada; **ΔCn**= Correlação normalizada.

Nos tratamentos de exposição a fenol e fenol+cromo foram identificados 1 e 2 spots, respectivamente (Tabelas 10 e 11).

Embora não tenha sido possível identificar todas as proteínas dos spots analisados, os resultados obtidos foram muito coerentes. Basicamente todas as proteínas identificadas ficaram divididas em dois grupos de acordo com sua função molecular, as quais predominaram as proteínas transportadoras e as do metabolismo.

Na tabela 10 verifica-se que para o mesmo spot foram identificadas 3 distintas proteínas. Por se tratar de um estudo metaproteômico, onde vários microrganismos estão sendo analisados ao mesmo tempo, pode-se inferir que isso ocorra pelo fato de coincidir proteínas, de igual massa molecular e ponto isoelétrico, de distintos microrganismos (Lacerda et al., 2007).

Tabela 10. Proteínas identificadas do tratamento de exposição a fenol.

Spot	MH+	De Novo	Score	Proteína	BLAST
5902	1476.0	MEEQQNAGVLQTK	100	ZP_00964734.1 ABC transporter, permease protein [<i>Sulfitobacter</i> sp. NAS-14.1]	MEEQQSAGV
5902	2394.2	YELFSWFACFSDAGQLNLAR	99	YP_001480710.1 extracellular solute-binding protein family 1 [<i>Serratia proteamaculans</i> 568]	FSDAGQINLAR
5902	1941.5	MNFKENGELVDLECDK	98	NP_761580.1 ABC-type amino acid transport, signal transduction systems, periplasmic component/domain [<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6]	NFTENGELHGI AVDL

De Novo=peptídeo seqüenciado “de novo”; Score=similaridade do alinhamento

4.3.5 Classificação funcional das proteínas identificadas

Como já mencionado anteriormente, todas as proteínas, independentemente do tratamento, ficaram restritas a dois principais grupos funcionais: proteínas transportadoras e metabólicas. Estas famílias de proteínas têm sido freqüentemente relatadas em estudos de exposição a compostos orgânicos e metais pesados.

O primeiro grupo funcional, das proteínas transportadoras, está diretamente relacionado à resistência a fenol (Santos, 2004) e a metais pesados (Nies, 1999; Nies, 2003; Sharma et al., 2006; Cheung & Gu, 2007).

As proteínas metabólicas podem estar ligadas a 3 principais mecanismos celulares: resistência, tolerância sustentada e adaptação (Lacerda et al., 2007).

Com base na Tabela 12 pode-se observar que o único tratamento que apresentou somente um grupo de proteína (entre as identificadas), com relação à função molecular, foi o de exposição a fenol.

O spot que foi analisado, originando a identificação das proteínas, foi sobre-expressado após 24 horas de exposição dos microrganismos a este contaminante, e as três proteínas identificadas estão envolvidas no sistema de transporte celular.

Tabela 11. Proteínas identificadas do tratamento de exposição a fenol+cromo.

Spot	Peptídeo	MH+	XC	ΔCn	Proteína
7602	K.FGIPQISTGDM*LR.A	1450.74	2.31	0.3	Q4KHK4 Q4KHK4_PSEF5 Adenylate kinase - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
7602	K.IAGKDDITGEDLVQR.K	1629.84	4.97	0.2	Q4KHK4 Q4KHK4_PSEF5 Adenylate kinase - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
7602	R.VYHTVYNPPK.I	1217.63	2.67	0.3	Q4KHK4 Q4KHK4_PSEF5 Adenylate kinase - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
7602	K.DDITGEDLVQR.K	1260.61	2.61	0.2	Q4KHK4 Q4KHK4_PSEF5 Adenylate kinase - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8503	K.VSIGDVSTAAQAANGVLAAA IAK.G	2098.15	5.69	0.3	Q4K8F4 Q4K8F4_PSEF5 ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein. - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8503	R.AEHLTLPADVQANLLPNEQY K.H	2364.22	5.32	0.3	Q4K8F4 Q4K8F4_PSEF5 ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein. - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8503	K.DNASADIGDVGAAGPIAVK. Q	1887.94	5.29	0.5	Q4K8F4 Q4K8F4_PSEF5 ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein. - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8503	K.DKDGWALAYTGTFIINKK .L	2339.24	5.07	0.5	Q4K8F4 Q4K8F4_PSEF5 ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein. - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8503	K.FAAEKDNASADIGDVGAAGF PIAVK.Q	2434.22	4.46	0.4	Q4K8F4 Q4K8F4_PSEF5 ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein. - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8503	K.HIDTDM*SSAQEIAK.F	1561.72	4.01	0.4	Q4K8F4 Q4K8F4_PSEF5 ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein. - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8503	K.NIQPALLM*FAEIAK.Q	1574.86	3.50	0.4	Q4K8F4 Q4K8F4_PSEF5 ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein. - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8503	R.LSLANPTIATM*EK.G	1404.74	3.47	0.3	Q4K8F4 Q4K8F4_PSEF5 ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein. - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
8503	K.LLHGSEAPK.S	951.53	1.67	0.1	Q4K8F4 Q4K8F4_PSEF5 ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein. - <i>Pseudomonas fluorescens</i>

MH+=valores de dipeptídeos; **XC**= correlação cruzada; **ΔCn**= Correlação normalizada.

Tabela 12. Resumo das proteínas identificadas com suas respectivas funções sintetizadas e o tratamento em que ocorreu a expressão.

Proteína	GF	Funções	TE
Q4K828 Q4K828_PSEF5 Arginine/ornithine ABC transporter, periplasmic arginine/orn - <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Transporte	Atividade de transporte http://expasy.org/uniprot/Q4K828	Cromo
Q48G10 Q48G10_PSE14 Arginine/ornithine ABC transporter, periplasmic arginine/orn - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>		Atividade de transporte http://expasy.org/uniprot/Q48G10	Cromo
ZP_00964734.1 ABC transporter, permease protein [<i>Sulfitobacter</i> sp. NAS-14.1]		Transporte-super familia ABC http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?view=...	Fenol
YP_001480710.1 extracellular solute-binding protein family 1 [<i>Serratia proteamaculans</i> 568]		Transporte ativo através da membrana citoplasmática http://www.embl-ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR006059	Fenol
NP_761580.1 ABC-type amino acid transport, signal transduction systems, periplasmic component/domain [<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6]		Transporte-Super familia ABC http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/...	Fenol
Q4K8F4 Q4K8F4_PSEF5 ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein. - <i>Pseudomonas fluorescens</i>		Atividade de transporte http://www.expasy.org/uniprot/Q4K8F4	Fenol + Cromo
Q48M80 Q48M80_PSE14 Putativa tabtoxinine-beta-lactam limiting dipeptidase - <i>Pseudomonas syringae</i>	Metabólica	EC 3.4.14.-Ligante de ions de zinco; Metalopeptidase; Hidrolase http://beta.uniprot.org/uniprot/Q48M80	Cromo
Q7WQP9 Q7WQP9_BORBR Oxidoreductase, large chain.		Oxidoreductase; Transporte de elétrons http://beta.uniprot.org/uniprot/Q7WQP9	Cromo
Q4KHK4 Q4KHK4_PSEF5 Adenylate kinase		EC 2.7.4.3 - Metabolismo energético http://expasy.org/uniprot/Q4KHK4	Cromo e Fe+Cr
Q4KKJ6 Q4KKJ6_PSEF5 Thiol:disulfide interchange protein, DsbA family. - <i>Pseudomonas fluorescens</i>		Homeostase oxidoreductiva celular http://beta.uniprot.org/uniprot/Q4KKJ6	Cromo

GF= Grupo funcional; TE= Tratamento em que ocorreu a expressão. Os links presentes nas células das funções dão acesso direto a base de dados, que contém todas as informações referentes a cada proteína.

A toxicidade de compostos orgânicos está diretamente ligada à bioacumulação na membrana citoplasmática, comprometendo seriamente a estrutura desta. A principal função da membrana celular dos microrganismos é formar uma barreira permeável que regula a passagem de solutos entre a célula e o ambiente externo (Nikaido, 1999), possuindo especial importância em processos energéticos da célula (Sikkema et al., 1995). Compostos orgânicos danificam a membrana por interferirem em funções vitais (fluxo de íons, metabólitos, lipídeos e proteínas; dissipação do gradiente de pH e potencial elétrico) ou pela inibição funcional de proteínas de membrana, que acabam por provocar a morte do microrganismo (Sikkema et al., 1995). Contudo, o efeito tóxico de um composto orgânico não depende somente da toxicidade inerente da molécula, mas também da tolerância da espécie (Ramos et al., 2002).

A tolerância a compostos aromáticos tem sido relacionada a 5 principais elementos: a) metabolismo de hidrocarbonetos, que contribui para a transformação em compostos atóxicos; b) aumento da rigidez da membrana celular via alteração da composição dos fosfolipídeos; c) alterações na superfície celular que tornam a célula menos permeável; d) formação de vesículas que removem os compostos tóxicos e e) efluxo dos compostos tóxicos em processo dependente de energia. Embora o mecanismo mais conhecido seja o metabolismo (biodegradação), este não é considerado o mais importante para sobrevivência celular, visto que alguns microrganismos altamente tolerantes a elevadas concentrações de hidrocarbonetos não os utilizam como fonte de carbono (Inoue & Korishi., 1989). Estes microrganismos toleram altas concentrações se utilizando de mecanismos de extrusão dos agentes tóxicos do citoplasma para o ambiente externo via bombas de efluxo (Lomovskaya et al., 2001) Estas bombas de efluxo são compostas por 3 componentes: sistema de extrusão na membrana citoplasmática, proteína de fusão e fator externo (Zgurskaya & Nikaido, 1999). Desta forma, proteínas de membranas, envolvidas no sistema de transporte celular estão diretamente envolvidas na tolerância de compostos orgânicos e drogas.

Entre estas proteínas, Ramos et al. (1998) constataram que as proteínas da superfamília ABC (transportadoras) conferem tal habilidade aos microgarnismos. Este

mesmo autor ainda relata que *Pseudomonas fluorescens* LP6a, que degrada uma grande variedade de hidrocarbonetos aromáticos, expressa constitutivamente proteínas que conduzem a bomba de efluxo para remover os hidrocarbonetos. Conforme Santos et al. (2004), que analisaram o proteoma de *Pseudomonas putida* frente ao efeito tóxico de fenol, as proteínas de membranas envolvidas no sistema de transporte (superfamília ABC, entre outros) desempenham um papel crucial no mecanismo de resistência celular.

Frente a essas evidências pode-se hipotetizar, que sob as condições experimentais de exposição a fenol, as proteínas transportadoras sobre-expressadas (Tabela 12) foram sintetizadas com o propósito de sustentar a tolerância ao agente tóxico.

Nos demais tratamentos (cromo e fenol+cromo) os spots escolhidos para identificação foram sobre-expressados nos primeiros 15 minutos de exposição. Como ambos tiveram uma tendência semelhante na expressão, assume-se que isto deveu-se ao efeito tóxico do cromo.

Os metais pesados, assim como o cromo, quando em altas concentrações impõem uma rápida e aguda toxicidade fazendo com os microrganismos rapidamente busquem alternativas metabólicas para superar o efeito deletério. A maior parte dos metais pesados é constituída de elementos de transição, que possuem os orbitais incompletamente preenchidos (Biro et al., 1995). Esta característica os torna agentes com alto potencial redox ativo que, uma vez no interior da célula pode desencadear uma série de reações adversas. Radicais hidróxidos assim formados são altamente reativos com moléculas bioativas. Por meio destas reações podem ocorrer peroxidação de lipídeos, que provoca o rompimento da membrana, e oxidação de proteínas, causando sua inativação (Sharma et al., 2006).

O cromo no ambiente ocorre principalmente como Cr^{+6} , na forma de cromato (um oxianion), e na forma de Cr^{+3} como um cátion trivalente, sendo que ambas as formas são termodinamicamente possíveis de existirem sob condições fisiológicas (Nies, 1999). A forma de cromato é a mais tóxica, sendo que nenhuma função biológica benéfica para microrganismos é conhecida. Por esta razão o metabolismo do cromo em bactérias ocorre somente como sistema funcional de detoxificação. A resistência a cromo está

provavelmente baseada em dois processos: redução e efluxo. Contudo, como nem todos os microrganismos possuem capacidade metabólica para reduzirem o cromo, o principal mecanismo de resistência utilizada é a extrusão. Além disso, o processo de redução biológica possui um alto gasto energético. Uma das principais vantagens do sistema de efluxo é o reduzido gasto energético e efeito compensatório que pode ocorrer. Aproximadamente é gasto 1 ATP por íon retirado da célula, mas pode haver um fluxo de entrada de íons gerando ATP, que compensa o gasto energético (Nies, 1999).

Como já comentado anteriormente o principal grupo de proteínas responsáveis pelas bombas de efluxo em microrganismos é a superfamília ABC (Lubelski et al., 2007), que tem seu nome derivado do inglês, **A**TP **B**inding **C**assete (Fath & Kolter, 1993).

A alta frequência de representantes desta família entre as proteínas identificadas neste experimento (Tabela 12), com rápida sobre-expressão diante da presença do cromo, indica a necessidade e a capacidade fisiológica de resposta a este contaminante. Basicamente, são conhecidos 3 mecanismos de resistência microbiana a metais pesados: O primeiro é a bioacumulação seguida da extrusão por bombas de efluxo; o segundo é a bio-redução, tornando os metais menos reativos e tóxicos, e finalmente o terceiro está ligado a afinidade de alguns cátions por enxofre, que assim podem ser complexados dentro de moléculas metal-tiol. Tióis são compostos orgânicos que possuem o grupo –SH (sulfidrilo), também são conhecidos como mercaptano, devido à capacidade de se ligar fortemente ao mercúrio (Fahey, 2001). A detoxificação de metais pesados ligados a complexos metal-tiol é realizada por meio de bombas de efluxo, contudo energia adicional é requerida. Já foi demonstrado que em substratos “*in vivo*” os complexos metal-tiol superam os metais livres (Sharma et al., 2000). Todavia, os tióis apresentam uma grande sensibilidade à auto-oxidação, refletindo a afinidade por metais pesados (Held & Biaglow, 1994). A auto-oxidação dos tióis produz como sub-produto espécies de oxigênio reduzido (compostos peróxidos) que são altamente tóxicos às células, e assim são requeridos mecanismos para minimizar a ocorrência da oxidação destes compostos e mitigar suas consequências (Pages et al., 2008). Desta forma, sob o feito tóxico de metais pesados há um rápido incremento na biossíntese de amino ácidos que contenham enxofre

(principalmente cisteína) visando à complexação dos cátions metálicos (Wang et al., 2001). Ao mesmo tempo é acionado o mecanismo para prevenir a auto-oxidação dos tióis, como observado no experimento.

Diante do efeito tóxico do cromo a proteína Thiol:disulfite interchange (Tabela 12) foi rapidamente sobre-expressada. De acordo com sua ontologia pesquisada na base de dados (UniProt), esta proteína possui função molecular na atividade di-sulfito oxiredutase, responsável por controlar reações oxidativas dos tióis. Com o mesmo propósito de controlar reações redox foi sobre-expressada uma proteína oxidoredutora inespecífica (Oxidoreductase, Q7WQP9).

A proteína tabtoxinine-beta-lactam limiting diptidase (Tabela 11) sobre-expressada frente ao cromo possui função de metalopeptidase. Estas proteínas catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em oligopeptídeos e polipeptídeos. Enzimas desta classe possuem íons metálicos quelados em seus sítios ativos, que são essenciais à atividade catalítica. As enzimas superóxido dismutases são metaloenzimas de proteção celular contra radicais peróxidos (Miller, 2004), que assim como as metalopeptidases possuem íons metálicos quelados em seus sítios ativos. Através de reações alternadas de oxidação e redução, com os metais presentes em seus sítios ativos, realizam a detoxificação provocada pelos radicais peróxidos (Eitinger, 2004). Desta forma, acredita-se que a metalopeptidase expressada no experimento possa estar envolvida de alguma forma na resistência ao cromo, mas por um mecanismo não entendido.

A proteína adenilato quinase foi sobre-expressada quando os microrganismos foram expostos a cromo e a fenol+cromo (Tabela 12). Esta proteína catalisa a reversível transferência do grupo fosfato terminal entre ATP (adenosina tri-fosfato) e AMP (adenosina mono-fosfato). Sua função enzimática está diretamente ligada ao metabolismo energético e biossíntese de nucleotídeos, sendo essencial para a manutenção e o crescimento celular microbiano (Leningher et al., 1995).

O estresse microbiano ocasionado pela presença dos contaminantes aciona uma série de mecanismos fisiológicos para sustentar a vida, que demanda uma grande

quantidade de ATP mediada pela ação de quinases, razão pela qual observa-se sua expressão.

Por fim há que perceber que a exposição aos contaminantes (Cromo, fenol e fenol+cromo) não afetou diretamente a viabilidade celular, durante o período de experimental, mas alterou a expressão de proteínas essenciais à resposta ao estresse e a sobrevivência.

4.4. CONCLUSÕES

- Contagens dos microrganismos cultiváveis “in vitro” não possuem sensibilidade para apontar respostas fisiológicas imediatas provocadas por estresse de agentes tóxicos;
- A presença do cromo aciona uma imediata resposta da população microbiana conferida pelo aumento qualitativo de proteínas expressadas;
- O fenol reprime qualitativamente o número de proteínas expressadas nos primeiros instantes de exposição seguido por um aumento na expressão ao longo do tempo;
- Sob efeito combinado de fenol mais cromo prevalece a resposta ao cromo, ocorrendo uma rápida indução de novas proteínas;
- Todas as proteínas identificadas estão diretamente envolvidas na resposta fisiológica ao estresse provocado pelos contaminantes;
- A metaproteômica é uma ferramenta analítica que possui sensibilidade para revelar mudanças nos perfis de proteínas expressadas por uma comunidade microbiana exposta a poluentes.

4.5 BIBLIOGRAFIA

AEBERSOLD, R. & MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v.422, p.198-205. 2003.

BIRO, B. *et al.* Metal sensitivity of some symbiotic N₂-fixing bacteria and *Pseudomonas* strains. **Acta Biologia Hungaria**. v.46, p.9–16. 1995.

CHAO, C. C. *et al.* Using LC-MS with de novo software to fully characterize the multiple methylations of lysine residues in a recombinant fragment of an outer membrane protein from a virulent strain of *Rickettsia prowazekii*. **Biochimica et Biophysica Acta** 1702, p.145–152. 2004.

CHEUNG, K. H. & GU, J. D. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.59, p.8–15. 2007.

EITINGER, T. In Vivo Production of Active Nickel Superoxide Dismutase from *Prochlorococcus marinus* MIT9313 Is Dependent on Its Cognate Peptidase. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.22, p.7821–7825. 2004.

FAHEY, R. C. Novel thiols of prokaryotes. **Annual Review Microbiology**, v.55, p.333-356. 2001.

FATH, M. J. & KOLTER, R. ABC Transporters: Bacterial Exporters. **Microbiological Reviews**, v.57, n.4, p. 995-1017. 1993.

HELD, K. D. & BIAGLOW, J. E. Mechanisms for the oxygen radical-mediated toxicity of various thiol-containing compounds in cultured mammalian cells. **Journal Radiation Research**, v.139, p.15-23. 1994.

INOUE, A. & KORIYOSHI, K. A *Pseudomonas* thrives i high concentrations of toluene. **Nature**, v.338, p.264-266. 1989.

LACERDA, C. M. R. *et al.* Metaproteomic Analysis of a Bacterial Community Response to Cadmium Exposure. **Journal of Proteome Research**, v.6, p.1145-1152. 2007.

LENINGHER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2 (Eds). São Paulo: Sarvier, pp.725. 1995.

LOMOVSKAYA, O. *et al.* Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.45, p.105-116. 2001.

LUBELSKI, J. *et al.* Distribution and Physiology of ABC-Type Transporters Contributing to Multidrug Resistance in Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.71, n.3, p.463–476. 2007.

MILLER, A. F. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. **Current Opinion Chemistry and Biology** v.8, p.162–168. 2004.

NIES, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**. v.27, p.313-339. 2003.

NIES, D.H. Heavy metal resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia spec. CH34*. **Extremophiles**, v.4, p.77-82. 2000.

NIES, D.H. Microbial heavy metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p.730-750. 1999.

NIKAIDO, H. Microdermatology: cell surface in the interaction of microbes with the external. **Journal Would Bacteriology**, v.181, p.4-8. 1999.

OGUNSEITAN, O.A. Soil Proteomics: Extraction and Analysis of Proteins from Soil. **Soil Biology**, v.8, p.95-115, 2006.

PAGES, D.; ROSE, J.; CONROD, S. Heavy Metal Tolerance in *Stenotrophomonas maltophilia*. **PLoS ONE** 3(2): e1539. doi:10.1371/journal.pone.0001539. 2008.

RAMOS, J. L.; DUQUE, E.; GODOY, P. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOTTIE. **Journal of Bacteriol**, v.180, p.3323-3329. 1998.

RAMOS, J. L.; DUQUE, E.; GALLEGOS, M. T. Mechanisms of Solvent Tolerance in Gram-Negative Bacteria. **Annual Review Microbiology**, v.56, p.743-768. 2002.

SANTOS, E.C. **Biodegradação do antraceno estimulada por ferro**. 2004. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SANTOS, P. M. *et al.* Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. **Proteomics**, v.4, p.2640–2652. 2004.

SCHULZE, W.X. *et al.* A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and soil particles. **Oecologia**, v.142, 335-343, 2005.

SHARMA, R. *et al.* The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)-translocating ATPase from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.3873-3878. 2000.

SHARMA, S. *et al.* Role of proteins in resistance mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. **Journal of Biotechnology**, v.126, p.374–382. 2006.

SIKKEMA, J. *et al.* Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology Review**, v.59, p.201-222. 1995.

SPARKS, D.L. **Environmental soil chemistry**. San Diego: Academic Press, pp.267. 1995.

STUCZYNSKI, T. I; MCCARTY, G. W.; SIEBIELEC, G. Response of soil microbiological activities to cadmium, lead, and zinc salt amendments. **Journal Environmental Quality**, v.32 , p.1346-1355. 2003.

TABB, D. L. *et al.* DTASelect and Contrast: tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics, **Journal Proteome Research**, v.1, p.21– 26. 2002.

TEDESCO, M.J. *et al.* **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 174p. 1995.

VALENZUELA, L. *et al.* Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. **Biotechnology Advances**, v.24, p.197-211. 2006.

WANG, C. L. *et al.* Aerobic sulfide production and cadmium precipitation by *Escherichia coli* expressing the *Treponema denticola* cysteine desulfhydrase gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56, p.425–430. 2001.

ZGURSKAYA, H. I. & NIKAIDO, H. AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. **Journal Molecular Biology**, v.285, p.409-420. 1999.

METAPROTEÔMICA DE SOLOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBONETOS, METAIS PESADOS E DEFENSIVOS AGRÍCOLAS¹

Santos, E.C.^{2*}; Chicano, E.G.³; López-Barea, J.³; Durrant, L.R.²

²Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana/FEA/UNICAMP, Campinas, SP.

³Laboratório de Proteômica Ambiental/Universidade de Córdoba, Córdoba, Espanha.

*ederrs@fea.unicamp.br

RESUMO

A remediação mediada por microrganismos possui grande potencial para a recuperação de ambientes contaminados, mas a falta de informações sobre fatores que regulam o crescimento e o metabolismo das comunidades microbianas nestes ambientes limita sua aplicação. Análises metaproteômicas possuem sensibilidade para acessar informações cruciais para um melhor entendimento das alterações fisiológicas decorrentes da presença de poluentes. No entanto, requerem eficientes protocolos de extração de proteínas do solo, livres de ácidos húmicos. Para a realização deste estudo foi desenvolvido um novo protocolo de extração e limpeza de proteínas do solo, que permitiu a separação de mais de 1600 spots bem resolvidos. O protocolo foi aplicado a distintos solos contaminados com hidrocarbonetos, metais pesados, defensivos agrícolas e a um solo sem histórico de contaminação que serviu de referência. As identificações das proteínas dos distintos solos revelaram vários mecanismos de respostas ao estresse imposto pelos contaminantes. Tais resultados demonstram que a metaproteômica possui grande potencial para ser aplicada em estudos de ambientes contaminados, revelando os mecanismos de resistência e resposta aos estressores. Nossos resultados representam o primeiro estudo metaproteômico *"in situ"* de solos contaminados.

Palavras chaves: Biomarcadores; biomonitoramento; proteínas; poluentes; estresse oxidativo.

¹ Artigo em preparação para ser submetido à revista **Nature Methods** (F.I.=14,95).

5.1 INTRODUÇÃO

A poluição do meio ambiente e a degradação das paisagens naturais são os maiores problemas globais da atualidade, pois afetam a maior parte dos países pobres e desenvolvidos. Grandes quantidades e variedades de compostos orgânicos e inorgânicos estão constantemente sendo introduzidos no meio ambiente em decorrência das atividades antrópicas. Os destinos finais destes contaminantes são a atmosfera, as águas (fluviais e marinhas) e o solo. Este último representa um dos mais complexos e produtivos ecossistemas, sendo a base da produção mundial de alimentos. A qualidade do solo está diretamente ligada a presença de microrganismos, os quais são os principais responsáveis pela degradação dos resíduos orgânicos e ciclagem dos nutrientes. A entrada de poluentes neste ambiente afeta significativamente toda dinâmica funcional da biomassa microbiana, resultando na redução da qualidade do solo.

A recuperação de áreas contaminadas representa um esforço multidisciplinar porque envolve a interação de inúmeros fatores físicos, químicos e biológicos. Muitos estudos têm sido realizados permitindo o entendimento dos principais fatores físicos e químicos, no entanto, existe uma grande lacuna de conhecimentos dos processos biológicos. A falta de ferramentas confiáveis para análise da dinâmica funcional dos microrganismos no solo representa um entrave no desenvolvimento de tecnologias para remediação de áreas impactadas.

As comunidades microbianas presentes nos solos são detentoras de uma imensa capacidade de adaptação e metabolização de compostos tóxicos, possibilitando, eficientemente, a restauração de ambientes degradados às suas condições “naturais”. Por este motivo, existe um enorme esforço científico na bioprospecção dos mecanismos fisiológicos que conferem tais habilidades aos microrganismos. Do ponto de vista investigatório, o grande desafio diz respeito ao desenvolvimento de uma ferramenta analítica, com sensibilidade para detectar alterações fisiológicas, que possa ser aplicada “*in situ*”. O solo é um ambiente aberto, extremamente complexo que têm suas propriedades regidas por fatores físicos, químicos e biológicos, que são dinâmicos e

interagem entre si. O conhecimento aprofundado de cada um destes fatores é elemento chave para o sucesso de qualquer análise neste ambiente.

Recentemente, algumas ferramentas para exploração das comunidades microbianas no solo foram desenvolvidas e estão baseadas na prospecção de mRNA (transcriptômica) e fragmentos de DNA (metagenômica). Estas técnicas representam um grande avanço na exploração filogenética das comunidades microbianas presentes no solo, no entanto, pouco pode ser apurado sobre a dinâmica funcional real. A transcriptômica está limitada principalmente por não haver uma correlação direta entre moléculas de mRNA transcritas e proteínas sintetizadas. Já a metagenômica se limita a predição da funcionalidade dos genes, sendo incapaz de gerar informações precisas sobre em quais circunstâncias reais, no ambiente, estes serão transcritos.

Nos últimos três anos, o grande avanço nas técnicas de proteômica ambiental permitiu o desenvolvimento de uma nova ênfase, a metaproteômica. Esta propõe a análise simultânea de todas as proteínas expressadas por uma comunidade microbiana, em um dado momento, frente a uma determinada situação. Desta forma, é esperado que esta possa expor as rápidas alterações fisiológicas decorrentes das alterações ambientais naturais ou provocadas pela entrada de poluentes no sistema. A identificação destas proteínas pode ser considerada como biomarcadores moleculares que podem ser empregados no monitoramento de processos biológicos como a biorremediação. Desta forma, a metaproteômica pode fornecer informações que não estão disponíveis por qualquer outro método conhecido até o presente momento.

A maior dificuldade encontrada para aplicação desta técnica é a extração das proteínas da matriz do solo. O desenvolvimento de protocolos eficazes representa um grande desafio, pois muitas características intrínsecas a cada pedoambiente pode reduzir a capacidade de extração das proteínas, tanto pela adsorção quanto pela co-extração de interferentes orgânicos e inorgânicos. Neste sentido, é esperado que a utilização de amostras de solos com distintas características físico-químicas (textura, granulometria, presença de contaminantes, entre outros) sejam imprescindíveis para se alcançar o êxito.

Com base no que foi explanado, o objetivo do presente estudo foi desenvolver um protocolo de extração de proteínas e analisar os perfis metaproteômicos de solos provenientes de áreas extremamente impactadas, buscando-se respostas fisiológicas em função dos agentes estressores. Para realização deste projeto foram coletadas amostras do Estuário Domingo Rubio. Este forma parte de um conjunto de zonas úmidas situadas na foz dos rios Tinto e Odiel, em Huelva, sul da Espanha. Esta paisagem natural se encontra potencialmente submetido a múltiplos impactos ambientais por sua proximidade ao maior complexo de indústrias petroquímicas e básicas da comunidade autônoma da Andaluzia. O estuário também está sujeito a possíveis alterações ambientais relacionadas com a contaminação hidroquímica do rio Huelva, que recebe rejeitos da atividade de mineração por meio dos rios Tinto e Odiel, e com a existência da exploração agrícola intensiva do cultivo de morangos (maior área plantada deste país). Desta forma, este local reuniu todas as características desejáveis para o desenvolvimento do estudo.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Coleta das amostras de solo

As amostras de solo foram coletadas em 3 locais distintos com histórico de contaminação por metais (Amostra S1, figura 2), hidrocarbonetos (Amostra S3, figura 3) e defensivos agrícolas (Amostra S9, figura 5), localizados no Estuário Domingo Rubio (Figura 1), e em local sem histórico de contaminação (Amostra controle, figura 4) dentro da área do Campus da Universidade de Huelva. Estas amostras foram coletadas em uma profundidade de 0-5 cm em vários pontos das áreas amostradas (Figura 6), formando uma amostra composta que posteriormente foi retirada uma sub-amostra para a realização dos experimentos. Todo material coletado foi acondicionado em caixas térmicas com gelo até o seu processamento no laboratório.



Figura 1. Estuário Domingo Rubio. A) Pólo petroquímico; B) Cultivo de morangos; C) Rio Tinto, que recebe rejeitos da atividade de mineração e possui elevada concentração de metais pesados.



Figura 2. Local de coleta da amostra S1, contaminada com metais pesados provenientes do Rio Tinto.



Figura 3. Local de coleta da amostra S3, contaminada por hidrocarbonetos de petróleo. A amostra foi retirada junto a saída do esgoto do pólo petroquímico.



Figura 4. Local de coleta da amostra controle, junto ao Campus da Universidade de Huelva (sem histórico de contaminação).



Figura 5. Local de coleta da amostra S9, contaminada por defensivos agrícolas utilizados no cultivo de morangos.



Figura 6. Detalhes das coletas, nos locais contaminados por hidrocarbonetos (complexo petroquímico) e defensivos agrícolas (intenso cultivo de morangos).

5.2.2 Processamento do solo no laboratório

As amostras coletadas no campo foram peneiradas e homogeneizadas, para retirar o excesso de material orgânico não decompostos.

5.2.3 Análises físico-químicas do solo

Após o processamento das amostras de solos, estas foram submetidas a análises físicas (granulometria), químicas (pH, carbono orgânico total, matéria orgânica, carbonatos, CE e Eh) segundo métodos propostos por Tedesco et al (1995).

5.2.4 Análises de contaminantes

As análises dos contaminantes orgânicos e inorgânicos foram realizadas no Departamento de Química Analítica da Universidade de Huelva, conforme os seguintes métodos padrões da Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA): Hidrocarbonetos totais de petróleo (método 418.1); compostos orgânicos voláteis (método 8260); herbicidas (método 8151A); pesticidas organoclorados (método 8081A); metais pesados (métodos 200.2 e 3051A). Todos estes métodos estão disponíveis on-line no site: <http://www.epa.gov/osa/fem/methcollectns.htm>

5.2.5 Extração direta das proteínas do solo

As amostras de solo, de 1 g de solo com 50% da capacidade de campo, foram pesadas dentro de tubos de micro centrífuga (1,5 mL de capacidade) contendo 100 µL de inibidor de protease (Sigma P 2714) e mais 1 mL de solução tampão extratora. A solução tampão extratora constituída por 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10% de sacarose, 2mM de dithiothreitol (DDT), 4 mM EDTA, 0,1% Brij 58 com o pH final ajustado para 7,58. O conteúdo dos tubos foram agitados em vortex (10 segundos) e imediatamente após foi realizada uma imersão em nitrogênio líquido, sendo repetido este procedimento 4 vezes. O descongelamento foi realizado a 25 °C. Após a lise o extrato protéico foi coletado através de centrifugação a 14.000 rpm por 10 min seguindo o método proposto por Ogunseitan (1993).

Como não foi obtido sucesso com nenhum protocolo existente na literatura desenvolvemos um protocolo próprio. Contudo, este não será demonstrado aqui por ainda não ter sido publicado.

5.2.6 Concentração do extrato protéico

Com objetivo de concentrar as proteínas extraídas, o extrato protéico foi submetido a diferentes métodos de concentração. Os métodos utilizados foram: concentração por redução do volume por Speed Vac, precipitação mediante os métodos de adição de acetona, ácido tricloroacético e sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$.

5.2.7 Limpeza do extrato protéico

A limpeza das proteínas foi realizada pela separação em fases do material orgânico solúvel em fenol e pela utilização do Kit comercial 2D-Clean-Up® Amersham.

5.2.8 Quantificação das proteínas e armazenamento

A quantificação da concentração final das proteínas foi realizada pelo método da reação de Bradford (Bio-Rad) seguida da leitura espectrofotométrica a 595 nm. Após a quantificação os extratos protéicos foram separados em alíquotas de 500 µL e congelados em ultra freezer -80 °C, sendo mantidos sob estas condições até o momento das análises.

5.2.9 Análises proteômicas

Devido a alta sensibilidade das técnicas de espectrometria de massas todas as fases que constam os estudos proteômicos se fizeram extremando as precauções necessárias para evitar a contaminação por queratina. Todo o material era lavado antes de seu uso com água destilada e etanol. Sempre se trabalhava com luvas previamente lavadas com etanol.

5.2.10 Primeira dimensão (Isoelectric focusing –IEF)

A separação das proteínas por ponto isoeletrico (isoelectroenfoque) foi realizado pelo sistema Bio-Rad IEF (Amersham Biosciences), utilizando géis de IEF (IPG Strips) de 18 cm com pH imobilizado de 4-7. Para isso, alíquotas dos substratos protéicos foram adicionados a um tampão de reidratação (TR) (8M urea, CHAPS 2% peso/volume, 1% azul de bromofenol, 0,5% tampão IPG) em um volume correspondente a concentração final de 150 µg de proteínas, respeitando o volume final total de 350 µL (amostra+TR). A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 30 minutos sendo posteriormente centrifugada a 14000 rpm por 1 minuto. Na seqüência a amostra foi posta em contato com o gel de IEF na câmara de reidratação, e se cobriu o gel com óleo mineral. Os géis de IEF foram submetidas a 6 horas de reidratação passiva seguido de 6 horas de reidratação ativa a 50 v, sendo na seqüência 3 rampas lineares de 1,5 h de 500, 1000, 2000 v, respectivamente e, 2 rampas rápidas de 2 h de 4000 e 8000 v, sob temperatura de 20 °C durante todo o processo, retirando-se as tiras após a obtenção de 53000 vh.

5.2.11 Segunda dimensão (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante em SDS foi realizada no sistema Protean® plus Dodeca™ cell (Bio-Rad) para géis de 18 cm. Previamente a eletroforese os géis de IEF foram equilibrados por 30 minutos sob fraca agitação em um tampão contendo 50 mM de 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 6 M urea, 30% glicerol, 2% SDS, 1% azul de bromofenol, com adição de DTT (10 mg.mL⁻¹ de tampão). Após ter sido equilibrado com DTT foi repetido o passo anterior, diferindo somente pela a adição de iodoacetamida ao tampão de equilibrado (45 mg.mL⁻¹ de tampão).

Os géis de IEF equilibrados foram colocados sobre os géis de acrilamida ((12,5%)-18x16x 0,1 cm), polimerizados no dia anterior ao uso, sendo posteriormente selados por agarose (0,5%) contendo azul de bromofenol.

A eletroforese foi realizada a 20 °C, sendo programado 2,5 W por gel por 5 min e 10 W por gel por aproximadamente 5,5 h.

5.2.12 Revelações dos géis

Os géis após fixação foram revelados por meio de Sypro Ruby® “overnight” (Bio-Rad).

5.2.13 Digitalização das imagens

Os géis revelados foram escaneados sob emissão de luz ultravioleta em um escâner Molecular Imager PharoFX® System (Bio-Rad). A resolução do escâner foi ajustada para 50 µm.

5.2.14 Armazenamento dos géis escaneados

Após a obtenção das imagens digitais os géis foram selados em filmes plásticos visando proteção contra danos mecânicos e contaminação, em câmara fria a 6 °C, até o momento da retirada dos spots.

5.2.15 Análise das imagens

As imagens digitalizadas foram analisadas utilizando-se os softwares PDQuest™ versão 8.1 (Bio-Rad) e ProteomWeaver™ versão 4.1 (Bio-Rad). A intensidade dos spots foi normalizada pelo método chamado “*Total Quantity in Valid Spots*”. Foram selecionadas os spots (proteínas separadas na eletroforese bidimensional) cuja expressão foi considerada significativamente diferente entre os géis.

5.2.16 Excisão dos spots

A excisão dos spots selecionados foi realizado sem manipulação humana em braço robô no equipamento Investigator ProPic™ Genomic Solutions™.

5.2.17 Digestão e preparo dos spots para espectrometria de massas

A digestão e preparo dos spots selecionados foi realizado mediante um braço robô, em um equipamento Investigator ProGest™ Genomic Solutions™ para evitar a mínima manipulação humana e assim diminuir o risco de contaminação das amostras. A digestão

enzimática das proteínas foi realizada pela adição mecânica de 15 μL de uma solução de tripsina (50 ng. μL^{-1} em NH_4HCO_3 25 mM pH 8,2). Na sequência foi eliminada a tripsina não absorvida, sendo adicionado NH_4HCO_3 20 mM. A extração dos peptídeos da digestão foi realizado mediante 3 lavagens com acetonitrila/água (1/1, v.v⁻¹) TFA 0,25%, seguido por 3 lavagens com acetonitrila.

5.2.18 Espectrometria de massas

A análise por espectrometria de massas foi realizada mediante o equipamento 4000 Q Trap[®] LC/MS/MS Applied Biosystems. Os parâmetros do equipamento foram ajustados utilizando uma mistura de 5 peptídeos padrões (angiotensina I, substancia P, e 3 peptídeos sintéticos com massas moleculares de 1578, 1911 e 2149 Da). A voltagem do spray foi de 0,85 kv e a temperatura do capilar foi ajustado para 110 °C. A amplitude da janela de isolamento de íon precursor foi de 3 unidades de massa e a energia de colisão foi de 30% (valor ótimo para íons de carga dupla). A informação obtida de cada peptídeo estudado inclui um espectro de varredura completo e um espectro de fragmentos gerados ou espectro MS/MS.

5.2.19 Identificação das proteínas (Bioinformática)

Para a identificação foi utilizado o programa PEAKS (Bioinformatics Solutions) e o programa de distribuição livre LutfiskXP (R.S.Johnson, <http://www.sourceforge.net>). Com as sequências *tags* obtidas foi realizada uma busca por homologia (BLAST), utilizando-se o programa Fasta (<http://fasta.biotech.virginia.edu/>). As bases de dados utilizadas foram Swiss-Prot (European Bioinformatics Institute, Heidelberg, Alemanha) e GenBank (National Center for Biotechnology Information, WA, Estados Unidos). As buscas foram realizadas em toda a amplitude de massa molecular e ponto isoelétrico e com restrição aos domínios *Bacteria* e *Fungi*. A ontologia e as funções moleculares das proteínas identificadas foram realizadas utilizando os softwares UniProt (Universal Protein Resource, <http://beta.uniprot.org/>) e ExPASy (Expert Protein Analysis System, <http://www.expasy.ch/>).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Caracterização físico-química das amostras de solo

O Estuário Domingo Rubio forma parte de um conjunto de zonas úmidas situadas na foz dos rios Tinto e Odiel, em Huelva, sul da Espanha. É um sistema típico de marisma salobre submetido a uma clara influência das marés com desenvolvimento de fluvisóis sálicos, ainda que em seu alto curso tenha sido modificado antropicamente, que determina características hidrodinâmicas e edáficas contrastadas com respeito ao tramo inferior. Esta paisagem natural se encontra potencialmente submetido a múltiplos impactos ambientais por sua proximidade a um complexo de indústrias petroquímicas e básicas.

O estuário também está sujeito a possíveis alterações ambientais relacionadas com a contaminação hidroquímica do rio Huelva, que recebe rejeitos da atividade de mineração por meio dos rios Tinto e Odiel, e com a existência da exploração agrícola intensiva de cultivo de morangos.

As análises físico-químicas das amostras de solo (Tabela 1) apresentaram uma textura homogênea, predominantemente siltosa. A composição mineralógica destes solos compreende essencialmente quartzo (10-50%), filosilicatos (40-90%) e feldspatos (<15%), junto com proporções subordinadas (<5%) de halita e hematitas.

Os filosilicatos dominantes são caolinita e ilita, junto com esmectita em alguns casos. Na parte alta do relevo os solos são arenosos e estão constituídos majoritariamente por quartzo (70-90%), devido ao aporte de abundante material detrítico procedente da erosão das areias pleistocênicas de seu entorno e de drenagem de várias partes mais áridas.

Os solos mais representativos foram os fluvisóis, com vegetação Halófitas típica de marisma, exceto no tramo lagunar que predominam espécies próprias de ambientes doces ou pouco salobre. Estes solos apresentam variação entre caráter reduzido ($E_h = -133$ mV) e oxidado ($E_h = +163$ a 290 mV), no geral são solos ácidos a moderadamente neutros. Em resumo, estes solos refletem em sua composição mineralógica os efeitos da

degradação física, em função da drenagem de resíduos mineiros e industriais, que induzem a neo-formação dos minerais como jarosita, gesso e vivianita.

Tabela 1. Características físico-químicas das amostras de solos contaminados e controle.

Amostra	pH	CE	Eh	Granulometria			M.O
	H ₂ O	mS	mV	AREIA	ARGILA	SILTE	(%)
S1	6,3	26,5	233	62,58	3,51	33,92	3,40
S3	4,5	8,21	290	27,88	10,20	61,93	2,82
S9	5,0	0,479	-133	62,44	5,78	31,78	3,86
Cont.	6,4	29,6	163	63,21	7,22	29,57	3,79

CE= condutividade elétrica; Eh= potencial redox; M.O= matéria orgânica

Com base nos resultados apresentados é importante entender que os microrganismos do solo vivem em um ecossistema que é dominado por partículas sólidas, com distintas áreas superficiais específicas (ASE), sendo estas, variáveis e dependentes da textura e da mineralogia. Partículas da fração coloidal podem exibir cargas permanentes ou variáveis, que as células microbianas e seus metabólitos podem interagir fortemente. As interações entre microrganismos e o solo podem ser classificadas em bióticas e abióticas.

Interações bióticas envolvem o crescimento, a multiplicação celular e a secreção de substâncias orgânicas, tais como enzimas e outros biopolímeros. As abióticas envolvem interações físicas e físico-químicas (arranjo de partículas, sorção, dissolução, entre outros; Chenu & Stotzky, 2002).

A interação de superfície dos microrganismos com as partículas do solo envolve vários passos: a) transporte para a superfície, b) contato e inicial adesão c) fixação d) crescimento, para formar microcolônias ou biofilmes (Grasso *et al.*, 1996), resultando na criação de um novo microambiente (Lavie & Stotzky, 1986). Desta forma, macromoléculas microbianas que são liberadas neste microambiente poderão ser imobilizadas nas partículas do solo. Enzimas extracelulares liberadas para assegurar a clivagem de polímeros, são prontamente adsorvidas em argilo-minerais através de pontes de

hidrogênio e interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Quiquampoix *et al.*, 1995). Valores de pH do solo inferiores ao ponto isoelétrico das proteínas proporcionam fortes interações eletrostáticas que ocorrem entre a superfície dos argilo-minerais carregados negativamente e proteínas carregadas positivamente (Quiquampoix *et al.*, 1992). Este comportamento cinético dá origem ao “fenômeno” chamado de enzimas imobilizadas do solo, que possuem maior estabilidade térmica e menor proteólise (Ruggiero *et al.*, 1996). Além disso, as proteínas podem interagir fortemente com a fração húmica do solo, uma vez que suas propriedades físico-químicas contrastam entre cadeias laterais hidrofílicas e hidrofóbicas (Quiquampoix, 2000). A interação com os ácidos húmicos do solo ocorre por meio de complexação ou reações covalentes (Allison, 2006).

Dentro deste contexto, pode-se assegurar que as características geomorfológicas das áreas onde foram realizadas as coletas, conferem a esses solos uma baixa reatividade eletroquímica, em termos de cargas permanentes do solo, devido ao predomínio de minerais 1:1 com baixa capacidade de troca de cátions. Entretanto, são possuidores de uma grande capacidade reativa com relação a cargas variáveis, dependentes do pH, em função dos elevados teores de matéria orgânica. O conhecimento aprofundado da matriz do solo se faz imprescindível para a otimização do protocolo de extração de proteínas e o completo sucesso de estudos metaproteômicos.

5.3.2 Análises de contaminantes

Os locais onde foram realizadas as amostragens são pontos georeferenciados pelo sistema de posicionamento global (GPS), possuindo um histórico conhecido que serve para o monitoramento do nível de contaminação do estuário. Cada ponto onde foram realizadas as amostragens possui uma contaminação específica mais acentuada (Tabelas 2 e 3).

As amostras foram classificadas em contaminadas por metais pesados (amostra S1), hidrocarbonetos (amostra S3) e defensivos agrícolas (amostra S9). Pode-se verificar que o solo controle apresenta todos os metais pesados, com exceção do urânio, detectados nas demais amostras. Embora em concentrações muito inferiores, isto

provavelmente ocorra devido a área de coleta estar sujeita a inundações por um afluente do rio Tinto, razão pela qual também se verifica a presença de hidrocarbonetos.

Tabela 2. Contaminantes detectados nas amostras de solo.

Amostras/ Contaminantes	Controle	S1	S3	S9
	$\mu\text{g g}^{-1}$ solo			
TPH	56,2	79,3	980	63,5
COV	ND	ND	86,3	ND
HER	ND	ND	ND	0,13
POC	ND	ND	ND	0,019

TPH= hidrocarbonetos totais de petróleo; COV= compostos orgânicos voláteis; HER= herbicidas (valor médio); POC= pesticidas organoclorados; ND= não detectado.

Tabela 3. Metais pesados detectados nas amostras de solo.

Amostras/ Metais pesados	Controle	S1	S3	S9
	$\mu\text{g g}^{-1}$ solo			
Cr	23,0	117	46,0	12,3
Co	1,9	26,8	2,9	16,2
Ni	3,3	42,8	12,6	6,5
Cu	313,6	2915	1112	2213
Zn	219,3	4257	316,3	319,1
As	112,2	1046	305,6	215,7
Sr	9,6	263	21,3	10,9
Cd	2,3	14,37	11,6	9,4
Pb	23,6	919	216,4	117,8
U	ND	27,9	12,1	ND

5.3.3 Extração direta das proteínas do solo

A extração das proteínas do solo é a fase mais crítica para a realização das análises metaproteômicas, porque o protocolo deve ser ajustado de maneira que seja capaz de recuperar a maior quantidade de extrato protéico possível com alto padrão qualitativo. A

dificuldade deve-se ao grande número de moléculas e íons interferentes que são co-extraídos juntamente com as proteínas.

No princípio iniciou-se utilizando métodos existentes na literatura (Ogunseitan 1993, 2006; Singleton 2003; Schulze *et al.*, 2004a, 2004b) para extração de proteínas de amostras ambientais, visando a otimização e padronização para as amostras. Estes métodos foram desenvolvidos para aplicação em SDS-PAGE (Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante por dodecil sulfato de sódio) e não foram aplicados em estudos proteômicos, que utilizam 2D-PAGE (Eletroforese bi-dimensional).

Com os extratos protéicos obtidos pelos métodos acima mencionados não se alcançou géis com padrão de separação e resolução suficiente para dar seqüência às análises subseqüentes. Pode-se observar que os extratos aplicados primeiramente a SDS-PAGE (Figura 7) e posteriormente a 2D-PAGE (Figura 8), não foram separados eficientemente formando muitos arrastes de proteínas, que impossibilita as análises das imagens.

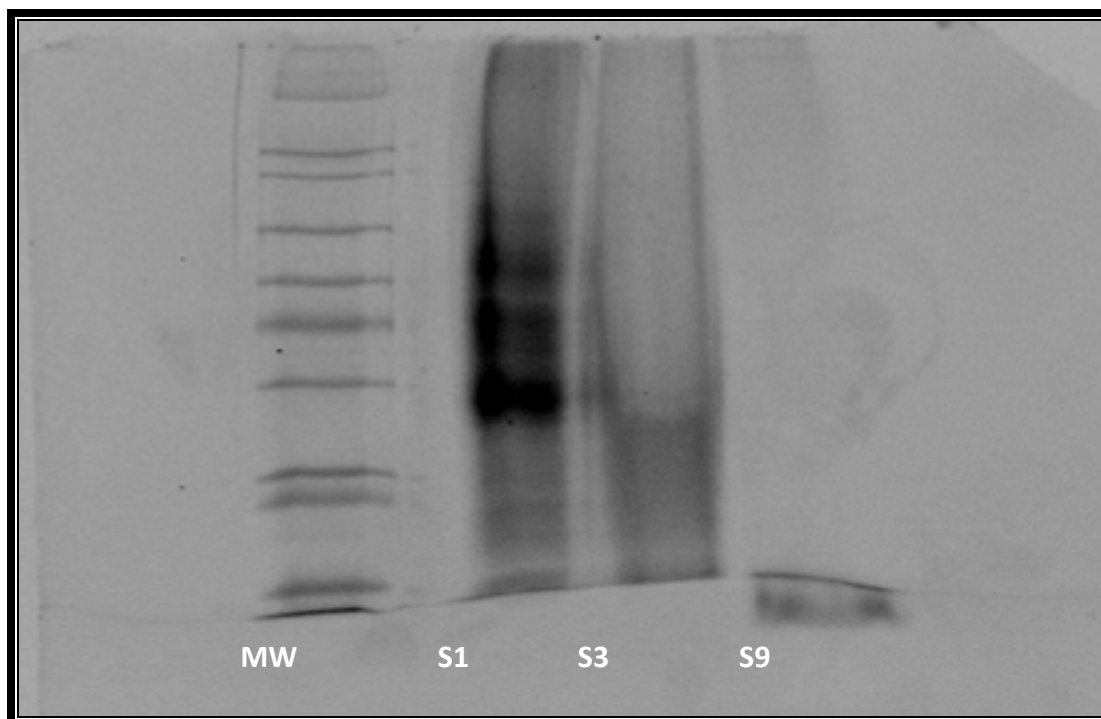


Figura 7. 1D-PAGE realizado com amostras extraídas com os protocolos existentes para amostras ambientais. MW= pesos moleculares.

Os arrastes, que podem ser horizontais ou verticais, são formados por vários fatores, porém de uma maneira geral ocorrem em função de aglomerados de proteínas que não estão totalmente solubilizadas e/ou pela presença de sais (força iônica) que prejudicam a movimentação eletroforética (Berkelman *et al.*, 2000a). Arrastes horizontais, em 2D-PAGE, indicam problemas ocorridos durante a focalização do ponto isoelétrico (IEF, primeira dimensão) e arrastes verticais indicam problemas durante a segunda dimensão (eletroforese).

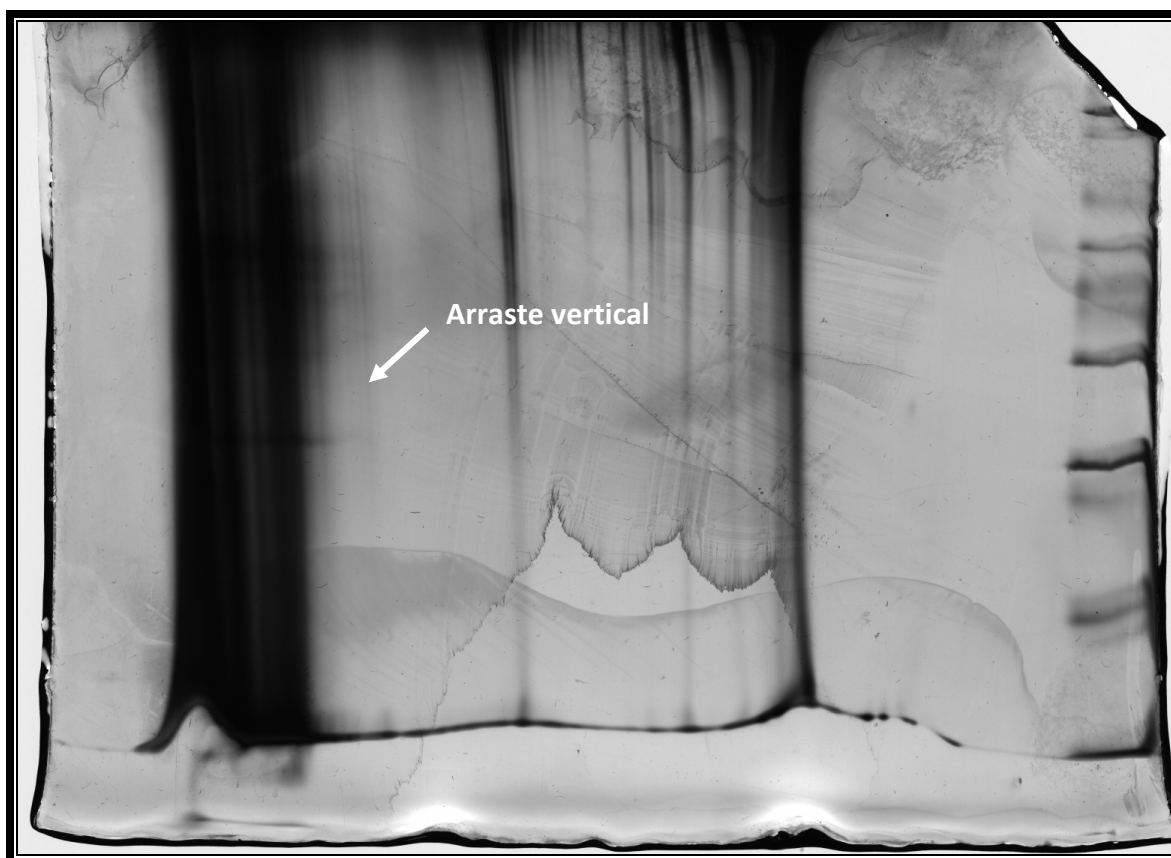


Figura 8. 2D-PAGE de extrato protéico do solo utilizando um dos protocolos existente na literatura. Todos os protocolos apresentaram separação e resolução muito semelhante a este gel.

Na primeira dimensão (IFE) a separação ocorre por meio do movimento eletroforético das proteínas submetidas a uma forte diferença de potencial elétrico. As proteínas vão sendo separadas em um gel de poliacrilamida, com um gradiente

imobilizado de pH, até encontrarem seu ponto isoelétrico (ponto de carga zero) e perderem a capacidade de migração. Contudo, para que as proteínas possam ser separadas eficientemente se faz necessário que as mesmas encontrem-se totalmente solubilizadas. Uma vez que isto não aconteça a separação torna-se ineficiente devido às proteínas não solubilizadas formarem aglomerados. Estes aglomerados são arrastados pelo movimento das proteínas solúveis, porém não se separam e provocam um efeito "semelhante a uma mola espichada" (Rabilloud *et al.*, 1996).

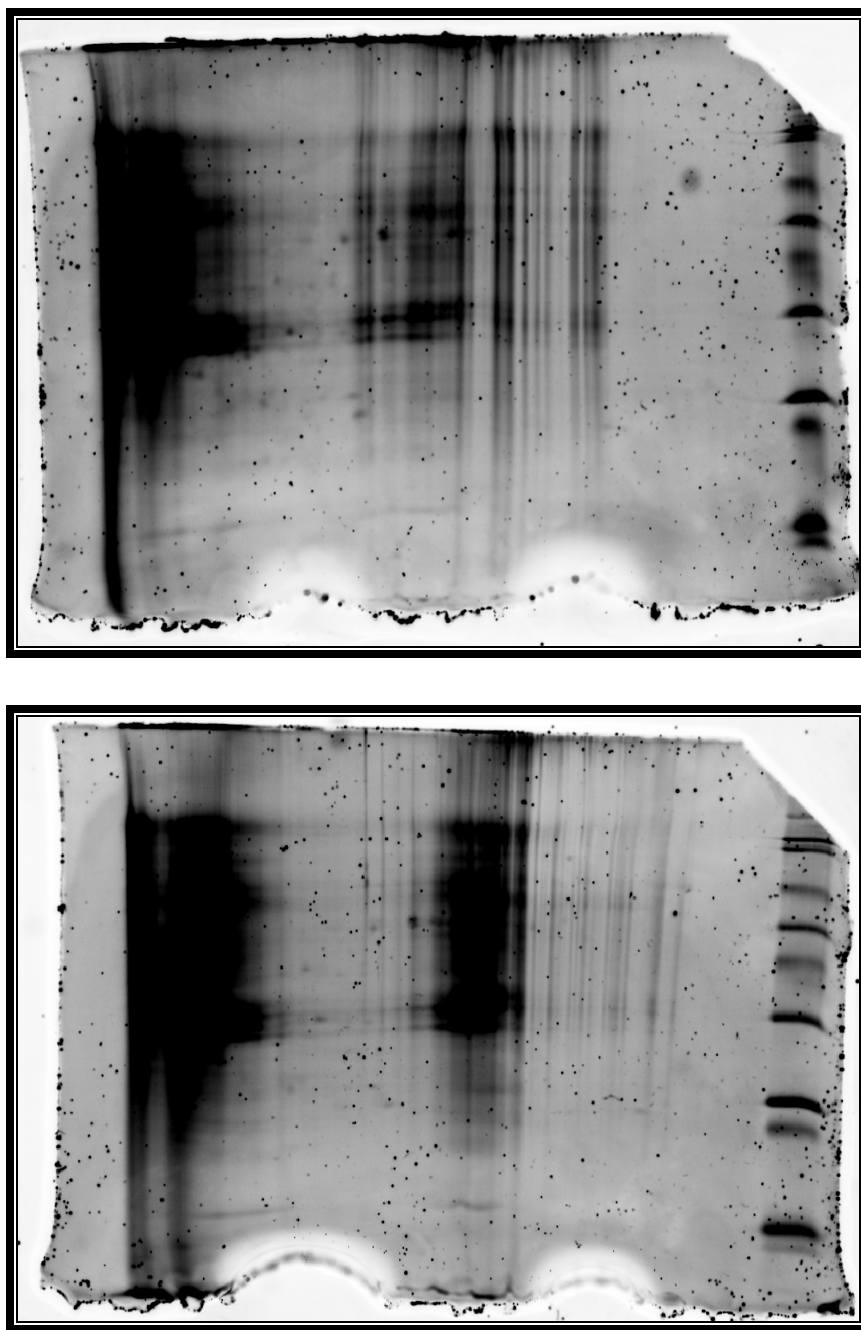
Assim, após a revelação do gel, o que é observado e a formação de manchas contínuas ao invés de bandas (SDS-PAGE) e spots (2D-PAGE) (Rabilloud *et al.*, 2000).

O primeiro procedimento adotado para tentar solucionar a formação dos arrastes foi a purificação das amostras pela eliminação de sais e adição de detergentes, visando a adequação da força iônica e proporcionando uma maior solubilização, respectivamente. A concentração de sais presentes nas amostras era muito elevada (Tabela 1) em função das subidas das marés, período em que os solos estudados estavam sujeitos ao alagamento por água salgada proveniente do avanço das águas marinhas sobre a laguna que forma o estuário Domingo Rubio.

Além disso, a concentração de proteínas extraídas pelos métodos aplicados foi muito baixa, sendo necessária aplicação de métodos para concentrar o extrato e assim indiretamente pode ter ocorrido a concentração dos sais presentes. Após várias modificações em todos os protocolos testados nenhum progresso visível foi observado (Figura 9).

Com base nestes resultados, pode-se deduzir que as amostras possuíam grande concentração de compostos orgânicos interferentes, possivelmente pela presença de substâncias húmicas, devido à coloração marrom do extrato (Aoyama, 2006). As substâncias húmicas são uma mistura complexa de compostos orgânicos, basicamente fenólicos, estáveis no solo, originários das degradações bióticas e abióticas do material orgânico. De fato, alguns autores como Criquet *et al.* (2002) e Wang *et al.* (2003) trabalhando com amostras ricas em compostos fenólicos apontaram os mesmos problemas aqui observados para as amostras de solo.

Para a confirmação de que os interferentes realmente se tratavam de substâncias húmicas foi realizado um procedimento de isolamento destes compostos, utilizando o método padrão da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS, <http://www.ihss.gatech.edu/soilhafa.html>), que resultou em resposta positiva.



Figuras 9. Géis 2D-PAGE após modificações dos protocolos. Os pontos pequenos são impurezas.

Assim, resolveu-se trabalhar no desenvolvimento de um protocolo que eliminasse estas substâncias orgânicas do extrato protéico do solo. O maior desafio neste procedimento foi a eliminação dos interferentes, que possuem características físico-químicas muito semelhantes às proteínas, sem que houvesse perda de material protéico durante o processo. Vários métodos descritos na literatura foram testados, mas nenhum êxito foi alcançado com os procedimentos adotados, demonstrando uma grande complexidade para separação e eliminação das substâncias húmicas sem que ocorresse perda de material protéico.

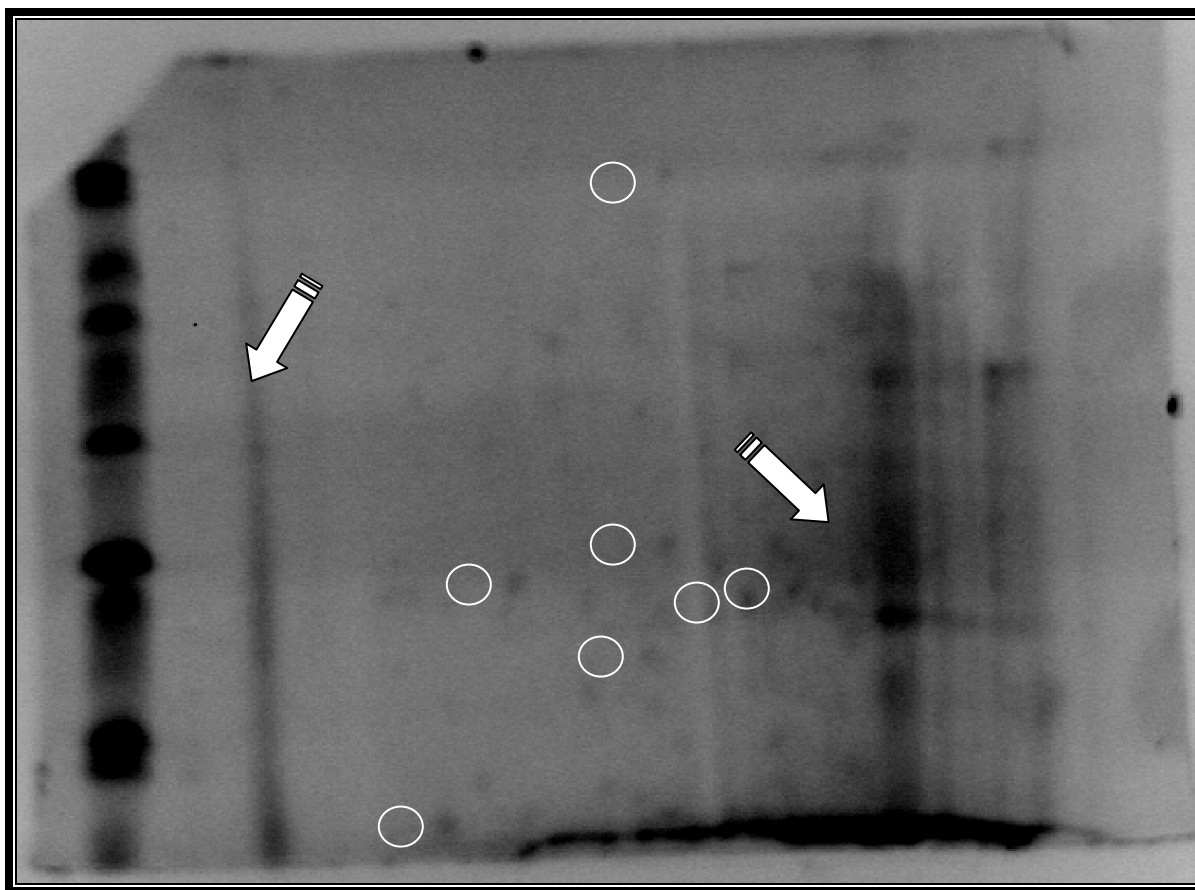
Diante da problemática ficou evidente a necessidade de elaborar um método de extração direta do solo que não extraísse substâncias húmicas, ou pelo menos reduzisse a quantidade extraída.

Atualmente sabe-se que a maior parte das células microbianas presentes no solo encontram-se adsorvidas (Chenu & Stotzky, 2002), por meio de interações físico-químicas, nas partículas minerais deste ambiente e envoltas a uma infinidade de compostos orgânicos que constituem a matéria orgânica do solo (McBride, 1994), como descrito no item 5.3.1. Por este motivo, protocolos que realizam a lise celular em meio às partículas do solo estão fadados a uma grande perda de proteínas por adsorção, além da co-extração de interferentes orgânicos (Benndorf *et al.*, 2007).

Após alguns meses dedicados ao desenvolvimento do protocolo de extração foram obtidos os primeiros géis com resolução aceitável para dar continuidade às análises, mas ainda possuindo alguns arrastes verticais (Figura 10).

Mesmo após o desenvolvimento do protocolo de extração, pode-se verificar uma variação na qualidade de resolução dos primeiros 2D-PAGE entre os distintos solos.

Estas diferenças na resolução possivelmente ocorreram em função das diferentes características físico-químicas intrínsecas a cada amostra, uma vez que não existe um protocolo universal que possa ser utilizado eficientemente a todos os tipos de solos (Wilmes & Bond, 2006).



Figuras 10. Primeiro gel obtido com resolução aceitável. As setas indicam a presença de arrastes verticais e os círculos demarcam alguns spots.

Na tabela 1 é possível constatar as diferenças nas características físico-químicas dos solos analisados e atribuir que em função destas características particulares foram obtidas as diferenças na resolução e separação das proteínas nos 2D-PAGE (Figura 11).

As eletroforeses bi-dimensionais revelaram uma razoável quantidade de spots, contudo, muitos arrastes horizontais e verticais ainda persistiam, com distintas intensidades entre as amostras de solo. Quando os 2D-PAGE permitem a visualização de spots, a formação dos arrastes são considerados problemas comuns que podem ser resolvidos com a melhoria das condições de IEF e eletroforese (Berkelman, 2000b).

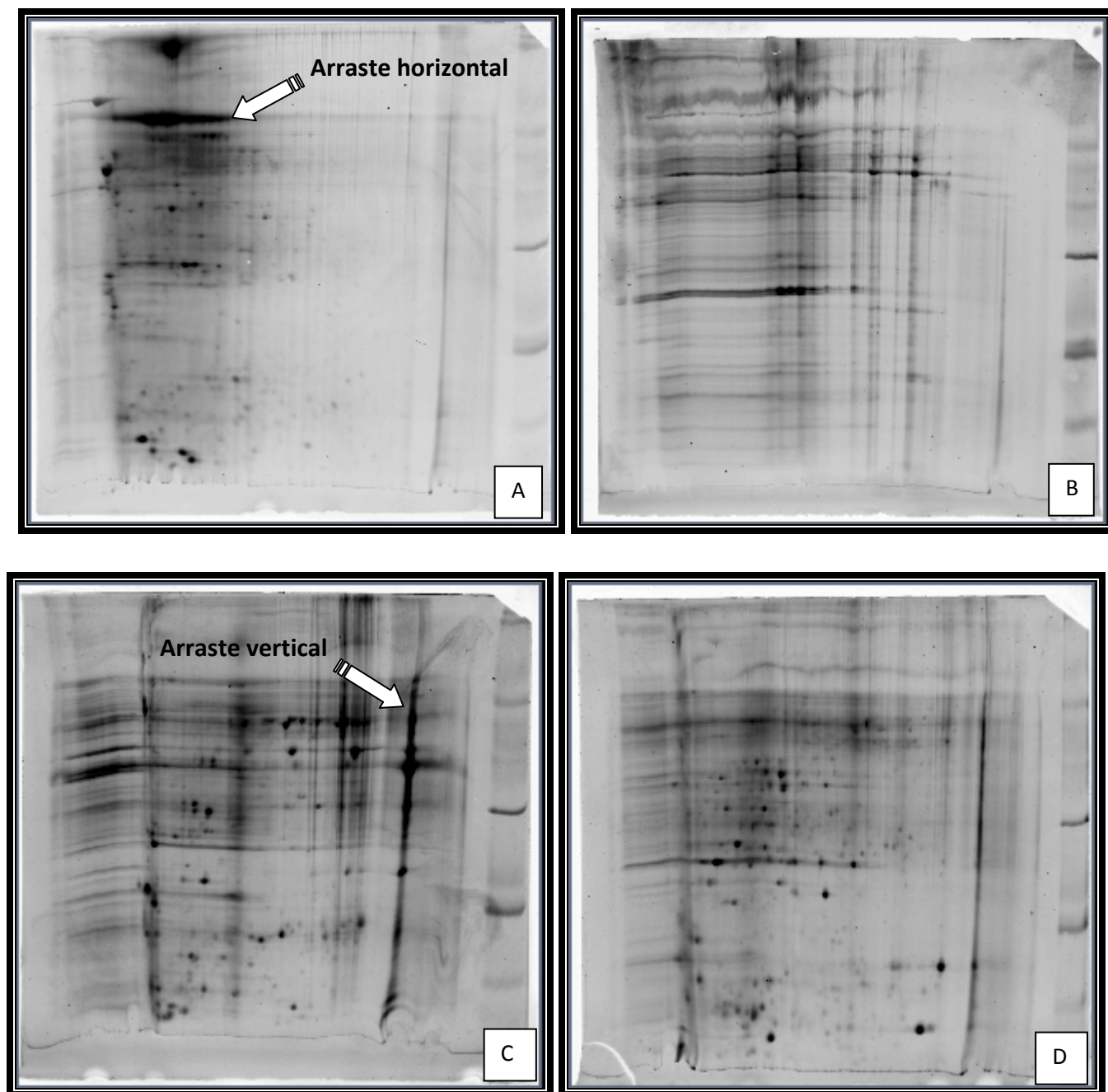


Figura 11. 2D-PAGE de amostras de solo, extraídas com o protocolo desenvolvido.

A) solo controle; B) solo contaminado por metais pesados (S1); C) solo contaminado por hidrocarbonetos (S3); solo contaminado por defensivos agrícolas (S9).

Por esta razão, a alternativa encontrada para dar seqüência aos estudos foi concentrar esforços na elaboração de um protocolo de limpeza. Após um período de dois

meses priorizando-se a otimização de um protocolo de limpeza foi possível elaborar um método que reproduziu géis com alta resolução e reprodutibilidade, praticamente sem arrastes (Figuras 12 a 14).

Os protocolos de extração e limpeza desenvolvidos apresentaram características fundamentais para a confiabilidade do método, primeiro: alta resolução em todos os géis independentemente da amostra de solo; segundo: alta reprodutibilidade e terceiro e mais importante: foi eficiente em recuperar proteínas em um amplo espectro de pI (ponto isoeletrico).

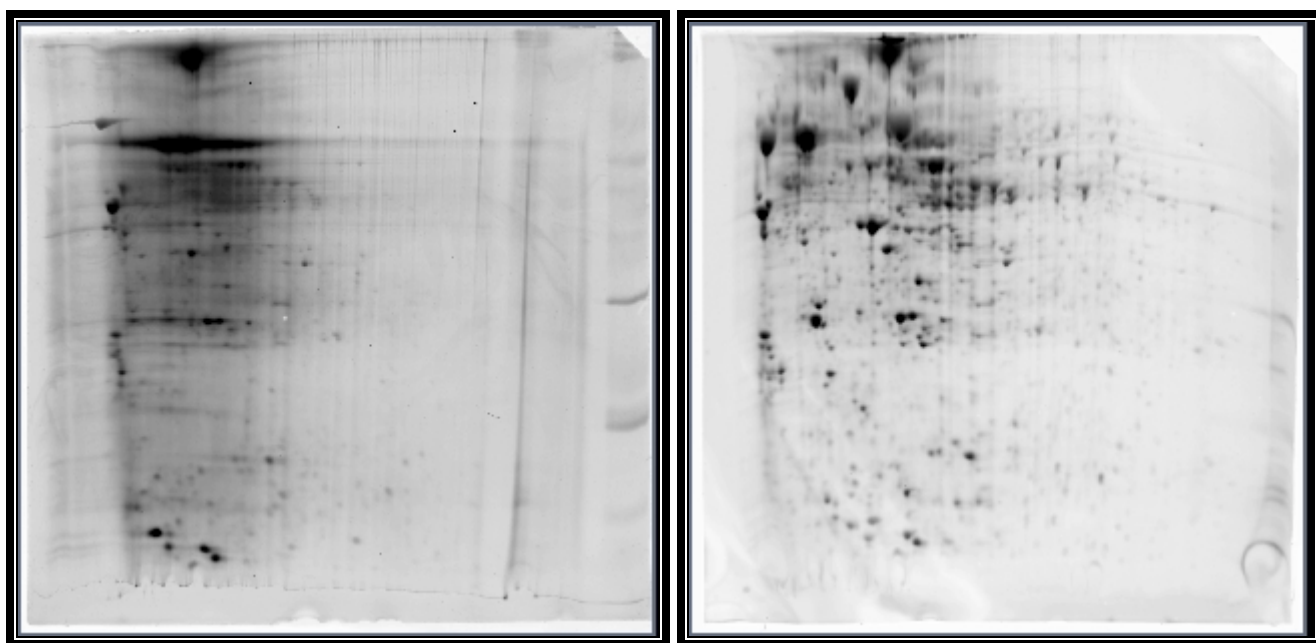


Figura 12. 2D-PAGE do solo controle, antes do uso do protocolo de limpeza (esquerda) e depois da limpeza (direita).

Como já mencionado no item 5.3.1 proteínas com ponto isoeletrico superiores aos valores de pH do solo deveriam ficar fortemente adsorvidas às partículas sólidas. No entanto, pode-se observar que os spots ficaram distribuídos em todo gel. Tomando como exemplo o solo S3 (Figura 13), que apresentou um pH de 4,5, seria esperado que um protocolo de extração ineficiente não recuperasse proteínas com pI superior a 4,5, contudo, pode-se verificar a presença de spots até próximo de 7,0 (os valores de pI nos

géis aumentam da esquerda para direita, partindo de 4 até 7). Estes resultados asseguraram a continuidade das análises metaproteômicas, sendo na sequência realizada as análises de imagens.

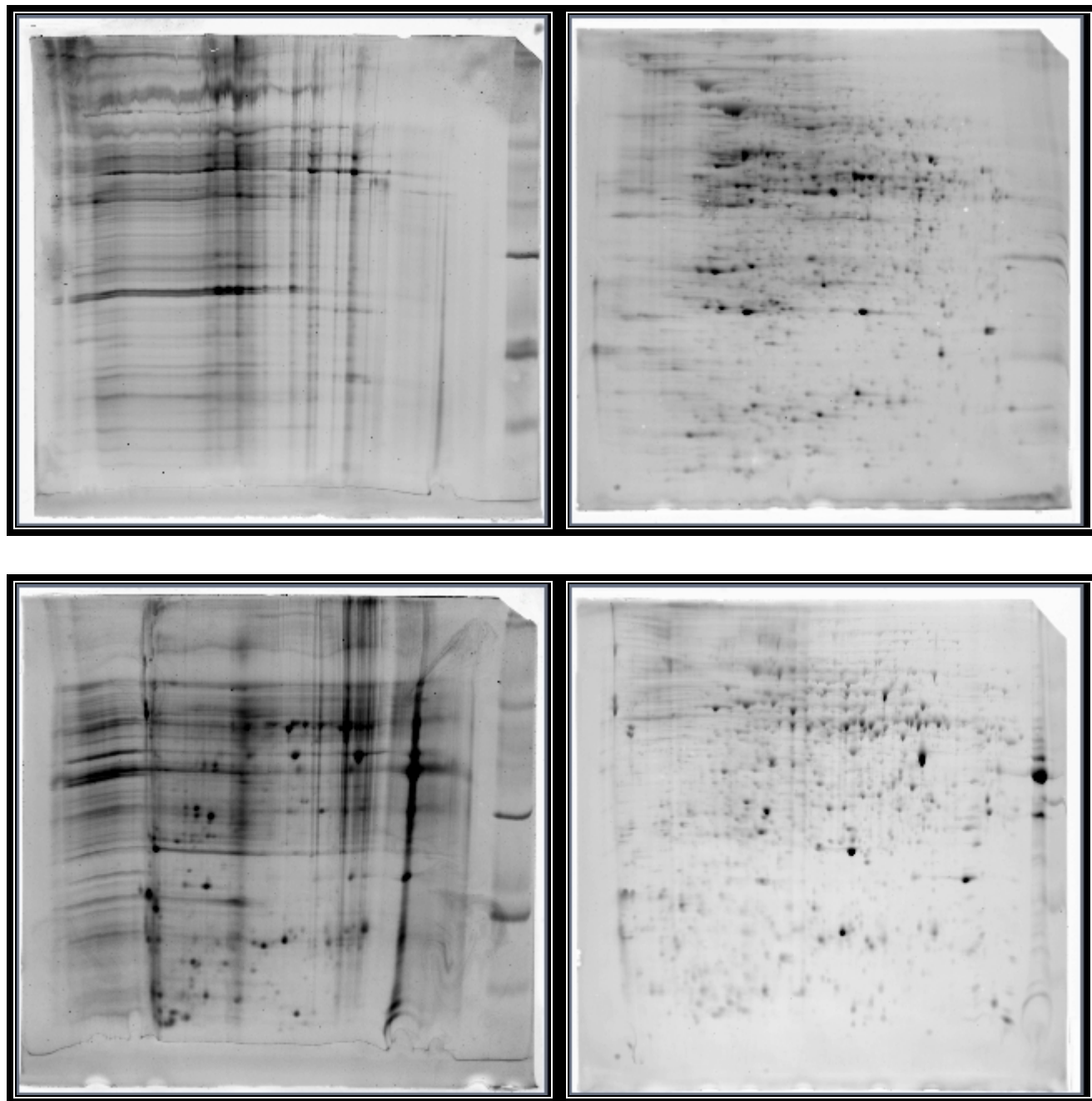


Figura 13. 2D-PAGE dos solos S1 (géis na parte superior) e S3 (géis na parte inferior), antes do uso do protocolo de limpeza (esquerda) e depois da limpeza (direita).

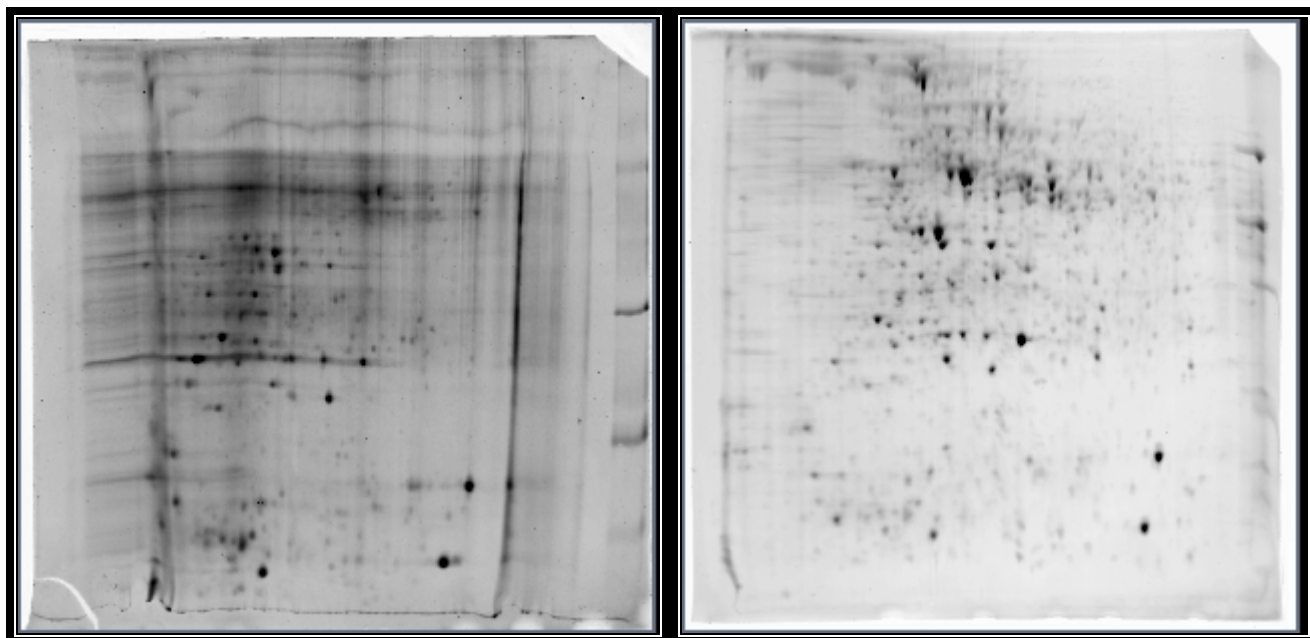


Figura 14. 2D-PAGE do solo S9, antes do uso do protocolo de limpeza (esquerda) e depois da limpeza (direita).

5.3.4 Análise de imagens

As análises de imagens foram realizadas utilizando dois softwares aplicados a bioinformática, PDquest 8.0 para as análises qualitativas e ProteomWeaver 4.0 para as análises quantitativas, assim escolhidos em função da sensibilidade do software para a análise desejada.

Inicialmente, desejava-se analisar as triplicatas de cada amostra de solo e confrontar todos os resultados entre as distintas amostras. Contudo, foi verificado que este procedimento seria inviável devido os perfis metaproteômicos serem muitos distintos, não possuindo um padrão comparativo. Este problema metodológico faz parte de todos os estudos metaproteômicos disponíveis na literatura internacional, uma vez que esta ciência ainda é muito incipiente (Lacerda *et al.*, 2007), não existindo padrões claros para a interpretação dos resultados alcançados, necessitando que muitos estudos ainda sejam realizados (Maron *et al.*, 2007). Kan *et al.* (2005) que realizaram estudos

metaproteômicos da baía Chesapeake, nos Estados Unidos, utilizaram a estratégia de sobreposição de todos os spots detectados automaticamente pelo software nos géis.

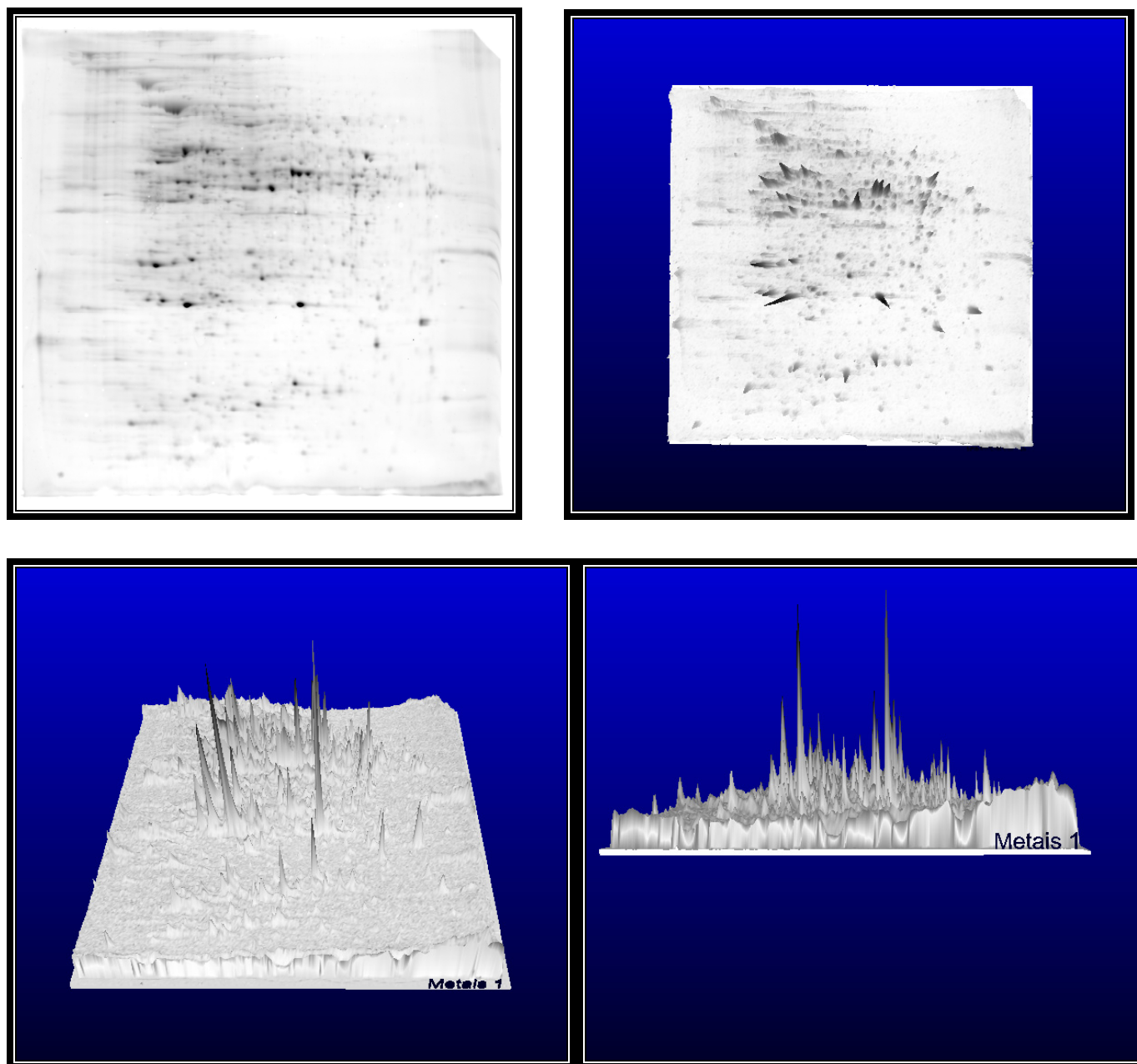


Figura 15. Análise de imagem tri-dimensional realizada para confirmação de spots, com finalidade de evitar falsos positivos. No canto esquerdo da parte superior imagem real do gel, na seqüência imagens 3D geradas pelo software.

Com base neste padrão que reúne todos os spots de todos os géis, foi realizada a comparação contra cada gel correspondente a um ponto de coleta e averiguada a similaridade entre os mesmos. Neste estudo a resolução dos géis permitiu a visualização de aproximadamente 200 spots por gel, sendo a similaridade entre replicatas de aproximadamente 92%, sendo encontrada uma similaridade de apenas 30% quando foram comparadas duas amostras de pontos distintos de coleta.

Quando adotou-se este método para realizar as análises de imagens aproximadamente 1600 spots foram detectados em cada 2D-PAGE, com uma similaridade igual ou superior a 93% entre replicatas (Apêndices 1 a 4), demonstrando uma grande robustez do método empregado. As comparações automáticas realizadas pelo software entre os distintos solos variaram de 71% até 80% de similaridade (Apêndices 5 a 10). Contudo, estas análises não são totalmente seguras porque pode haver muitos falsos positivos que o software detecte como spot verdadeiro.

Assim sendo, decidiu-se realizar análises gerais com ajuste manual para cada spot detectado, dos quais avaliou-se a densitometria e confirmação por meio de imagens tri-dimensionais de cada gel analisado (Figura 15).

Desta forma, a escolha dos spots para a análise de espectrometria de massas foi realizada com base na densitometria absoluta e desvio padrão. Para ser escolhido o spot deveria apresentar elevada densidade e baixo desvio padrão. Outros parâmetros que foram levados em consideração, com menor relevância, foram o ponto isoelétrico e a massa molecular relativa, buscando a maior distribuição no gel possível. Ao final das análises 9 spots (em triplicata) de cada solo contaminado e controle foram escolhidos (Apêndices 1 a 4).

5.3.5 Identificação das proteínas por espectrometria de massas

A partir dos espectros obtidos na análise por MALDI-TOF foi decidido realizar análises no capLC- μ ESI-ITMS/MS. Os espectros de MS/MS obtidos foram submetidos ao software de busca SEQUEST. Para a identificação das proteínas foi criada uma base de dados para bactérias a partir de dados FASTA disponíveis no UniProt.

Todos esses procedimentos foram realizados para se obter uma máxima identificação das proteínas, uma vez que peptídeos de organismos de genoma desconhecido (não seqüenciados) somente serão identificados se este compartilhar uma identidade de seqüência elevada com respeito a alguma das proteínas reportadas nas bases de dados.

Além disso, para garantir a identificação evitando-se resultados falso-positivos foram adotados os seguintes critérios: análise da correlação cruzada (Xc) e correlação normalizada (ΔCn). O Xc tem função de mensurar a similaridade da relação massa-carga (m/z) de fragmentos entre o valor predito de seqüências de aminoácidos publicados e o valor observado dos espectros de MS/MS. Já o ΔCn discrimina a alta qualidade do espectro mesmo quando este tenha sido ajustado a espectro teórico (Chao *et al.*, 2004). Como regra geral, valores maiores que 2,0 para Xc e 0,1 para ΔCn garantem uma análise de alta qualidade (Tabb *et al.*, 2002), e assim, somente os resultados enquadrados dentro destes parâmetros foram considerados como identificação positiva.

Com base nos critérios adotados foi possível analisar 7 spots do solo controle, totalizando 17 proteínas diferentes identificadas (Apêndice 11). Nos solos contaminados por metais pesados (S1), hidrocarbonetos (S3) e defensivos agrícolas (S9), todos os spots analisados permitiram a identificação de 23, 37 e 31 proteínas distintas, respectivamente (Apêndices 12 a 14).

Dentre as proteínas identificadas, considerando que estas procedem dos spots quantitativamente mais expressados nos perfis metaproteômicos, podemos verificar claras diferenças entre funções moleculares em cada solo analisado. Tomando como base o número total de proteínas identificadas do solo controle (Tabela 4), podemos dizer que predominaram as proteínas de função metabólica, representando aproximadamente 41% (7 proteínas), seguido por chaperonas (29%), superóxido dismutase (17%) e de transporte (6%). No solo contaminado por metais pesados, entre as proteínas identificadas, aproximadamente 39% foram proteínas do metabolismo, 30% superóxido dismutase, 13% chaperonas, 9% de transporte e igualmente com 4% de síntese proteica e de função desconhecida (Tabela 5).

Tabela 4. Funções das 17 proteínas identificadas do solo controle.

Proteína	Sinônimos	Similaridade	Função
Q0VRW6 CH60_ALCBS 60 kDa chaperonin - <i>Alcanivorax borkumensis</i>	Protein Cpn60 groEL protein	chaperonin (HSP60) family	Chaperona
Q3KMQ9 CH60_CHLTA 60 kDa chaperonin - <i>Chlamydia trachomatis</i>	Protein Cpn60 groEL protein 57 kDa chlamydial hypersensitivity antigen	chaperonin (HSP60) family	Chaperona
A1K436 A1K436_AZOSB 60 kDa chaperonin. - <i>Azoarcus</i> SP	Nenhum	chaperonin (HSP60) family.	Chaperona
A1U292 A1U292_MARAV 60 kDa chaperonin. - <i>Marinobacter aquaeolei</i>	Protein Cpn60 groEL protein	chaperonin (HSP60) family.	Chaperona
Q8CWJ0 CH602_VIBVU 60 kDa chaperonin 2 - <i>Vibrio vulnificus</i>	Protein Cpn60 2 groEL protein 2	chaperonin (HSP60) family.	Chaperona
Q17VC6 Q17VC6_HELAH 60 kDa chaperonin. - <i>Helicobacter acinonychis</i>	Protein Cpn60 groEL protein	chaperonin (HSP60) family.	Chaperona
Q9K9H0 ACEA_BACHD Isocitrate lyase - <i>Bacillus halodurans</i>	EC 4.1.3.1 Isocitrase Isocitratase ICL	isocitrate lyase family	Metabolismo
Q1IHE4 Q1IHE4_ACIBL Isocitrate lyase - <i>Acidobacteria bacterium</i>	EC 4.1.3.1	isocitrate lyase family	Metabolismo
A1TJ41 A1TJ41_ACIA ATP synthase F1, beta subunit - <i>Acidovorax avenae</i> subsp. citrulli	EC 3.6.3.15	ATPase alpha/beta chains family	Metabolismo
Q8ENS3 Q8ENS3_OCEIH Isocitrate lyase - <i>Oceanobacillus iheyensis</i>	EC 4.1.3.1	isocitrate lyase family	Metabolismo
Q0BDY7 Q0BDY7_BURCM Isocitrate lyase - <i>Burkholderia cepacia</i>	EC 4.1.3.1	isocitrate lyase family	Metabolismo
Q6FFK0 ATPB_ACIA ATP synthase subunit beta - <i>Acinetobacter</i> sp	EC 3.6.3.14 ATPase subunit beta ATP synthase F1 sector subunit beta	ATPase alpha/beta chains family.	Metabolismo
A7Z4E9 A7Z4E9_BACA2 FtsZ. - <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Ftsz	Ftsz family	Metabolismo
Q486R2 Q486R2_COLP3 Putative phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-bi - <i>Colwellia psychrerythraea</i>	NE	NE	Transporte
Q9KD10 SODM_BACHD Superoxide dismutase [Mn] - <i>Bacillus halodurans</i>	EC 1.15.1.1	iron/manganese superoxide dismutase family	Superoxido dismutase
A0RIP9 A0RIP9_BACAH Superoxide dismutase, Mn - <i>Bacillus thuringiensis</i>	EC 1.15.1.1	iron/manganese superoxide dismutase family	Superoxido dismutase
A4G7Y8 A4G7Y8_HERAR Superoxide dismutase, iron - <i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	EC 1.15.1.1	iron/manganese superoxide dismutase family	Superoxido dismutase

NE= não encontrado na base de dados (UniProtKB/TrEMBL).

As funções moleculares das proteínas identificadas do solo contaminado por hidrocarbonetos (Tabela 6) predominantemente ficaram relacionadas ao sistema de transporte (30%) e a de síntese de proteínas (27%). Neste solo as proteínas do metabolismo representaram 22% e as superóxido dismutase 5%, e não foi possível estabelecer função para 16% (função desconhecida na base de dados).

Com aproximadamente 58% as chaperonas predominaram no solo contaminado por defensivos agrícolas (Tabela 7), seguido pelas de síntese de proteínas com 29%. Deste modo, estes dois grupos de funções moleculares alcançaram 87% do total das proteínas identificadas, sendo que as superóxido dismutases, de função desconhecida, de síntese de ácidos nucleicos e de degradação participaram igualmente com 3%, cada uma destas.

Tabela 5. Funções das 23 proteínas identificadas no solo contaminado por metais pesados (S1).

Proteína	Sinônimos	Similaridade	Função
A3N121 A3N121_ACTP2 10 kDa chaperonin. - <i>Actinobacillus pleuropneumoniae serotype</i>	groES	groES chaperonin family	Chaperona
A3D8X0 A3D8X0_SHEB5 10 kDa chaperonin. - <i>Shewanella baltica</i>	groES	groES chaperonin family	Chaperona
Q12S62 Q12S62_SHEDO 10 kDa chaperonin. - <i>Shewanella denitrificans</i>	groES	groES chaperonin family	Chaperona
Q1IEI5 Q1IEI5_PSEE4 Nucleoside diphosphate kinase - <i>Pseudomonas entomophila</i>	EC 2.7.4.6 NDK NDP kinase Nucleoside-2-P kinase	NDK family	Metabolismo
Q4K6U5 NDK_PSEF5 Nucleoside diphosphate kinase - <i>Pseudomonas fluorescens</i>	EC 2.7.4.6 NDK NDP kinase Nucleoside-2-P kinase	NDK family	Metabolismo
A0LBZ0 A0LBZ0_MAGSM Nucleoside diphosphate kinase - <i>Magnetococcus sp</i>	EC 2.7.4.6	NDK family	Metabolismo
A3D8Q2 A3D8Q2_SHEB5 Ribosomal protein L9. - <i>Shewanella baltica</i>	NE	ribosomal protein L9P family	Síntese de proteínas
A3D710 A3D710_SHEB5 Ycel family protein - <i>Shewanella baltica</i>	NE	Belongs to the UPF0312 family- Type 1 subfamily.	Desconhecida
Q02H75 Q02H75_PSEAB Superoxide dismutase - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EC 1.15.1.1	iron/manganese superoxide dismutase family	Superoxido dismutase
Q6FCJ6 Q6FCJ6_ACID Superoxide dismutase [Fe] - <i>Acinetobacter sp</i>	EC 1.15.1.1	iron/manganese superoxide dismutase family	Superoxido dismutase

...Continuação da Tabela 5.

Proteína	Sinônimos	Similaridade	Função
Q1IE87 Q1IE87_PSEE4 Superoxide dismutase [Fe] - <i>Pseudomonas entomophila</i>	EC 1.15.1.1	iron/manganese superoxide dismutase family	Superoxido dismutase
A1S6W9 A1S6W9_SHEAM Superoxide dismutase - <i>Shewanella amazonensis</i>	EC 1.15.1.1	iron/manganese superoxide dismutase family	Superoxido dismutase
A1U285 A1U285_MARAV Superoxide dismutase - <i>Marinobacter aquaeolei</i>	EC 1.15.1.1	iron/manganese superoxide dismutase family	Superoxido dismutase
A3D3H6 A3D3H6_SHEB5 Superoxide dismutase - <i>Shewanella baltica</i>	EC 1.15.1.1	iron/manganese superoxide dismutase family	Superoxido dismutase
Q083G8 Q083G8_SHEFN Superoxide dismutase - <i>Shewanella frigidimarina</i>	EC 1.15.1.1	iron/manganese superoxide dismutase family	Superoxido dismutase
A0KNH4 A0KNH4_AERHH Serine hydroxymethyltransferase - <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	EC 2.1.2.1 Serine methylase SHMT	SHMT family	Metabolismo
Q6F7X1 MDH_ACIAD Malate dehydrogenase - <i>Acinetobacter</i> SP	EC 1.1.1.37	LDH/MDH superfamily. MDH type 2 family	Metabolismo
Q88R52 Q88R52_PSEPK Amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding p - <i>Pseudomonas putida</i>	NE	ABC transporter superfamily	Transporte
Q1I3F2 Q1I3F2_PSEE4 Putative amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid - <i>Pseudomonas entomophila</i>	NE	ABC transporter superfamily	Transporte
A3D204 A3D204_SHEB5 NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase. - <i>Shewanella baltica</i>	NE	NE	Metabolismo
Q1LN75 Q1LN75_RALME Fructose-bisphosphate aldolase - <i>Ralstonia metallidurans</i>	EC 4.1.2.13	class II fructose-bisphosphate aldolase family	Metabolismo
A0KNH4 A0KNH4_AERHH Serine hydroxymethyltransferase - <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	EC 2.1.2.1 Serine methylase SHMT	SHMT family	Metabolismo
A3D7D0 A3D7D0_SHEB5 Serine hydroxymethyltransferase - <i>Shewanella baltica</i>	EC 2.1.2.1 Serine methylase SHMT	SHMT family	Metabolismo

NE= não encontrado na base de dados (UniProtKB/TrEMBL).

Para uma correta interpretação das funções moleculares distintas, das proteínas quantitativamente mais expressadas nos perfis metaproteômicos, se faz imprescindível o entendimento do conceito de estresse ambiental microbiano e como ocorre sua resposta. O estresse pode ser definido como qualquer alteração no genoma e/ou proteoma, que produz uma diminuição na taxa de crescimento ou na sobrevivência (Vorob'eva, 2004). De uma maneira geral, os microrganismos possuem relativamente poucas opções de adaptação às constantes alterações no ambiente (Hazen & Stahl, 2006). Embora motilidade e quimiotaxia sejam importantes para otimização do ambiente físico químico

local, estes não promovem proteção a rápidas mudanças. Assim, a alternativa microbiana é uma rápida adaptação envolvendo um ou mais sistemas de resposta ao estresse. Entretanto, estudos relacionados a estresse ambiental estão em sua maioria restritos a condições de laboratório, reduzindo a caracterização real de resposta de uma população em um ambiente aberto e dinâmico como o solo, onde os microrganismos estão constantemente sendo sujeitos a múltiplas mudanças físico-químicas e expostos a uma grande variedade de estressores (Hazen & Stahl, 2006).

Tabela 6. Funções das 37 proteínas identificadas no solo contaminado por hidrocarbonetos (S3).

Proteína	Sinônimos	Similaridade	Função
Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - <i>Pseudomonas putida</i>	NE	NE	Desconhecida
Q116R2 Q116R2_PSEE4 Putative uncharacterized protein. - <i>Pseudomonas entomophila</i>	NE	NE	Desconhecida
Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - Q48D34 Q48D34_PSE14	NE	ABC transporter superfamily	Transporte
Translation elongation factor Tu. - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. Q7M7F1 Q7M7F1_CHRVO	EF-Tu	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily	Síntese de proteínas
Translation elongation factor Tu - <i>Chromobacterium violaceum</i>	EC 3.6.5.3	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily	Síntese de proteínas
Q11FW8 Q11FW8_PSEE4 Protein chain elongation factor - <i>Pseudomonas entomophila</i>	EF-Tu-A EF-Tu-B	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily	Síntese de proteínas
Q83ES6 Q83ES6_COXBU	EF-Tu	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily	Síntese de proteínas
Translation elongation factor Tu. - <i>Coxiella burnetii</i>	EF-Tu	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily	Síntese de proteínas
Q1R0H7 Q1R0H7_CHRSD	EF-Tu	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily	Síntese de proteínas
Translation elongation factor 1A - <i>Chromohalobacter salexigens</i>	EF-Tu-A	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily	Síntese de proteínas
Q88QP8 EFTU1_PSEPK Elongation factor Tu-A - <i>Pseudomonas putida</i>	Duplicate of tufB	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily	Síntese de proteínas
Q6FDS5 Q6FDS5_ACIAD Protein chain elongation factor EF-Tu - <i>Acinetobacter sp</i>	EF-Tu	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily	Síntese de proteínas
Q9Z9L6 EFTU_BACHD Elongation factor Tu - <i>Bacillus halodurans</i>	NE	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily	Síntese de proteínas
A4VHL6 A4VHL6_PSEU5	Translation elongation factor Tu. - <i>Pseudomonas stutzeri</i>	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily	Síntese de proteínas
A1TJ05 A1TJ05_ACIAC Translation elongation factor Tu - <i>Acidovorax avenae</i> subsp. citrulli	Translation elongation factor 1A EF-1A/EF-Tu	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily	Síntese de proteínas
Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - <i>Pseudomonas putida</i>	NE	NE	Desconhecida

...Continuação da Tabela 6.

Proteína	Sinônimos	Similaridade	Função
Q88P52 ARCA_PSEPK Arginine deiminase - <i>Pseudomonas putida</i>	EC 3.5.3.6 ADI Arginine dihydrolase AD	arginine deiminase family	Metabolismo
Q1I5H4 Q1I5H4_PSEE4 Arginine deiminase - <i>Pseudomonas entomophila</i>	EC 3.5.3.6	NE	Metabolismo
Q02EJ4 Q02EJ4_PSEAB Arginine deiminase. - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NE	NE	Metabolismo
A4VHD1 A4VHD1_PSEU5 Arginine deiminase. - <i>Pseudomonas stutzeri</i>	NE	NE	Metabolismo
A3MJP2 A3MJP2_BURM7 Arginine deiminase - <i>Burkholderia mallei</i>	EC 3.5.3.6	NE	Metabolismo
Q88M48 Q88M48_PSEPK ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas putida</i>	NE	ABC transporter superfamily	Transporte
Q1IDF0 Q1IDF0_PSEE4 Putative ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas entomophila</i>	NE	ABC transporter superfamily	Transporte
A0RPY3 A0RPY3_CAMFF ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein. - <i>Campylobacter fetus</i> subsp. fetus	NE	ABC transporter superfamily	Transporte
Q48L83 Q48L83_PSE14 ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein. - <i>Pseudomonas syringae</i> pv.	NE	ABC transporter superfamily	Transporte
Q02Q81 Q02Q81_PSEAB Putative ABC transporter, periplasmic substrate-binding prot - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NE	ABC transporter superfamily	Transporte
Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>	NE	ABC transporter superfamily	Transporte
Q1I3W0 Q1I3W0_PSEE4 Putative uncharacterized protein. - <i>Pseudomonas entomophila</i>	NE	UPF0312 family. Type 1 subfamily [view classification]	Desconhecida
Q1I3F2 Q1I3F2_PSEE4 Putative amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid- - <i>Pseudomonas entomophila</i>	NE	ABC transporter superfamily	Transporte
Q88R52 Q88R52_PSEPK Amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding p - <i>Pseudomonas putida</i>	NE	ABC transporter superfamily	Transporte
Q3KJK1 Q3KJK1_PSEPF Extracellular solute-binding protein, family 3 - <i>Pseudomonas fluorescens</i>	NE	NE	Transporte
Q1IEI5 Q1IEI5_PSEE4 Nucleoside diphosphate kinase - <i>Pseudomonas entomophila</i>	EC 2.7.4.6	NDK family	Metabolismo
Q02H75 Q02H75_PSEAB Superoxide dismutase - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	EC 1.15.1.1	iron/manganese superoxide dismutase family	Superoxido dismutase
A0KI41 A0KI41_AERHH Superoxide dismutase - <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	Fe EC 1.15.1.1	iron/manganese superoxide dismutase family	Superoxido dismutase

...Continuação da Tabela 6.

Proteína	Sinônimos	Similaridade	Função
Q88D47 Y4981_PSEPK UPF0312 protein PP_4981 - <i>Pseudomonas putida</i>	NE	UPF0312 family, Type 1 subfamily	Desconhecida
Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>	NE	ABC transporter superfamily	Transporte
Q1I3W0 Q1I3W0_PSEE4 Putative uncharacterized protein. - <i>Pseudomonas entomophila</i>	NE	UPF0312 family, Type 1 subfamily	Desconhecida
Q1IEI5 Q1IEI5_PSEE4 Nucleoside diphosphate kinase - <i>Pseudomonas entomophila</i>	EC 2.7.4.6 NDK NDP kinase Nucleoside-2-P kinase	NDK family	Metabolismo
A0LBZ0 A0LBZ0_MAGSM Nucleoside diphosphate kinase - <i>Magnetococcus sp</i>	EC 2.7.4.6	NDK family	Metabolismo

NE= não encontrado na base de dados (UniProtKB/TrEMBL).

É evidente que o limite de adaptação de qualquer espécie a um estressor específico pode variar enormemente quando o microrganismo está exposto simultaneamente a múltiplos estressores (Boor, 2006). De maneira geral existem duas respostas ao estresse: a imediata regulação e subsequente resposta fisiológica, que promoverão mudanças no transcriptoma, proteoma, metaboloma e na arquitetura celular. Desta forma, mudanças na estrutura do mRNA e proteínas fazem parte da primeira linha de defesa celular (Winkler, 2005; Narberhaus *et al.*, 2006). Nos últimos anos tornou-se claro que, além da regulação da expressão de genes específicos, existe um sistema global de regulação que controla a simultânea expressão de um grande número de genes em resposta a uma variedade de estresses ambientais (Zhao & Poh, 2008). Conforme Wright & Lewis (2007) a múltipla resposta a estresses ambientais pode causar um grande número de alterações celulares incluindo respostas fisiológicas, bioquímicas e comportamentais para prevenir ou reparar danos causados. Tais respostas são sintetizadas com a expressão de transportadores, chaperonas, modificadores de membrana e a alteração no padrão de proteínas metabólicas. O primeiro destes sistemas globais de substancial importância é o “Heat shock” resposta. Este sistema é responsável pela indução de um grande grupo de proteínas (heat shock proteins, Hsp) mediante exposição a alta temperaturas e a outras condições que promovam desnaturação proteica, tais como presença de compostos orgânicos e metais pesados (Giard *et al.*, 2002). Perturbações tais como exposição celular a hidrocarbonetos e outras condições de estresse produzem

respostas prontamente perceptíveis por meio de análises proteômicas das quais se têm observado, mediante o produto destes proteomas funcionais, a identificação de muitas Hsp induzidas em resposta a vários estímulos (Monahan *et al.*, 2001). A resposta do sistema “Heat shock” é universal e muitas das Hsp (que são chaperonas) são altamente conservadas entre espécies, permitindo assim um melhor entendimento destas sob distintas condições de estresse (Münchbach *et al.*, 1999).

As chaperonas são consideradas como um sistema universal de resposta ao estresse porque previnem danos que são normalmente comuns a muitos tipos de estressores. Muitos estressores têm como ação principal a danificação do DNA, oxidação de macromoléculas e a desnaturação de proteínas (Park *et al.*, 2000).

A desnaturação de proteínas é o maior evento que está associado aos mais diversos tipos de estresse, sendo que o principal mecanismo de resposta associado a este estresse é a síntese de chaperonas (Georgopoulos & Welch, 1993). A acumulação celular de proteínas parcialmente desnaturadas, que possuem suas regiões hidrofóbicas expostas, permitem a adesão das chaperonas para recuperar o dano. A depleção na quantidade de moléculas de chaperonas serve como sinal de indução para a ativação da síntese destas (Sanders *et al.*, 1999). As chaperonas previnem interações indesejáveis entre superfícies potencialmente complementares das proteínas, permitindo que a conformação proteica seja mantida, que é essencial a bioatividade da molécula (Martin & Hartl, 1993).

Com base na identificação das proteínas pode-se constatar que todos os solos, incluindo o solo controle, apresentaram diferentes mecanismos de resistência às perturbações do ambiente. A expressão de chaperonas foi quantitativamente a maior resposta entre os distintos grupos funcionais, alcançando aproximadamente 24% do total identificado.

No solo controle foram verificadas proteínas de resposta ao estresse tais como chaperonas, superóxido dismutases e metabólicas (Ftsz). Inicialmente este solo foi assim estabelecido por não apresentar um histórico de contaminação, contudo, as análises químicas apontaram a presença de metais pesados e hidrocarbonetos. Embora em

pequenas concentrações, é provável que a presença destes contaminantes tenha desencadeado o sistema de resposta.

Tabela 7. Funções das 31 proteínas identificadas do solo contaminado por defensivos agrícolas (S9).

Proteína	Sinônimos	Similaridade	Função
Q6FDS5 Q6FDS5_ACIAD Protein chain elongation factor EF-Tu - <i>Acinetobacter</i> sp	Duplicate of tufB	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily	Síntese de proteínas
A1TJ05 A1TJ05_ACIAC Translation elongation factor Tu - <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	Translation elongation factor 1A EF-1A/EF-Tu	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily.	Síntese de proteínas
Q1LSY4 Q1LSY4_BAUCH Translation elongation factor Tu. - <i>Baumannia cicadellinicola</i> subsp. <i>Homalod</i>	EF-Tu	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily.	Síntese de proteínas
A3M1F6 A3M1F6_ACIBT Protein chain elongation factor EF-Tu. - <i>Acinetobacter baumannii</i>	NE	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily.	Síntese de proteínas
A1JIH3 A1JIH3_YERE8 Elongation factor TU. - <i>Yersinia enterocolitica</i> serotype O:8 / b	NE	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily	Síntese de proteínas
A1TP96 MDH_ACIAC Malate dehydrogenase - <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	EC 1.1.1.37	LDH/MDH superfamily. MDH type 2 family.	Metabolismo
Q0KAA6 Q0KAA6_RALEH Catechol 1,2-dioxygenase - <i>Ralstonia eutropha</i>	EC 1.13.11.1		Degradação
Q6F7X1 MDH_ACIAD Malate dehydrogenase - <i>Acinetobacter</i> sp	EC 1.1.1.37	LDH/MDH superfamily. MDH type 2 family.	Metabolismo
Q6FDS5 Q6FDS5_ACIAD Protein chain elongation factor EF-Tu - <i>Acinetobacter</i> sp	Duplicate of tufB	GTP-binding elongation factor family. EF-Tu/EF-1A subfamily.	Síntese de proteínas
A3M928 MDH_ACIBT Malate dehydrogenase - <i>Acinetobacter baumannii</i>	EC 1.1.1.37	LDH/MDH superfamily. MDH type 2 family.	Metabolismo
A1TP96 MDH_ACIAC Malate dehydrogenase - <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	EC 1.1.1.37	LDH/MDH superfamily. MDH type 2 family.	Metabolismo
Q6F7X1 MDH_ACIAD Malate dehydrogenase - <i>Acinetobacter</i> sp	EC 1.1.1.37	LDH/MDH superfamily. MDH type 2 family.	Metabolismo
A3M928 MDH_ACIBT Malate dehydrogenase - <i>Acinetobacter baumannii</i>	EC 1.1.1.37	LDH/MDH superfamily. MDH type 2 family.	Metabolismo
A3M750 A3M750_ACIBT Protein chain elongation factor EF-Ts. - <i>Acinetobacter baumannii</i>	EF-Ts	EF-Ts family	Síntese de proteínas
Q6FA54 EFTS_ACIAD Elongation factor Ts - <i>Acinetobacter</i> sp	EF-Ts	EF-Ts family	Síntese de proteínas
Q9PPX5 EFTS_UREPA Elongation factor Ts - <i>Ureaplasma parvum</i>	EF-Ts	EF-Ts family	Síntese de proteínas
P00911 TRPC_ACIAD Indole-3-glycerol phosphate synthase - <i>Acinetobacter</i> sp	EC 4.1.1.48 IGPS	trpC family	Metabolismo
Q6FCJ6 Q6FCJ6_ACIAD Superoxide dismutase [Fe] - <i>Acinetobacter</i> sp	EC 1.15.1.1	iron/manganese superoxide dismutase family.	Superoxido dismutase

...Continuação da Tabela 7.

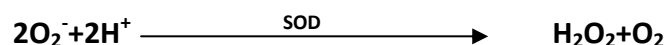
Proteína	Sinônimos	Similaridade	Função
Q6FB14 Q6FB14_ACIAD Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase - <i>Acinetobacter</i> sp	PPlase Rotamase EC 5.2.1.8	cyclophilin-type PPlase family. PPlase cyclophilin-type domain.	Metabolismo
A6SZV2 A6SZV2_JANMA Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B - <i>Janthinobacterium</i> sp	EC 5.2.1.8	cyclophilin-type PPlase family. PPlase cyclophilin-type domain.	Metabolismo
A1B209 A1B209_PARDP DNA polymerase, beta-like. - <i>Paracoccus denitrificans</i>	NE	NE	Síntese de ácido nucleico
Q0KCB1 Q0KCB1_RALEH Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin family - <i>Ralstonia eutropha</i>	EC 5.2.1.8	cyclophilin-type PPlase family. PPlase cyclophilin-type domain	Metabolismo
A3M6J2 A3M6J2_ACIBT Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase - <i>Acinetobacter baumannii</i>	EC 5.2.1.8	cyclophilin-type PPlase family. PPlase cyclophilin-type domain	Metabolismo
Q02Q31 Q02Q31_PSEAB Putative flavodoxin. - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			Metabolismo
Q6FAK2 Q6FAK2_ACIAD Alkyl hydroperoxide reductase, C22 subunit, thioredoxin-like - <i>Acinetobacter</i> sp	Detoxification of hydroperoxides EC 1.11.1.15	NE	Metabolismo
A0KJ17 A0KJ17_AERHH Alkyl hydroperoxide reductase subunit C - <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	EC 1.11.1.15	NE	Metabolismo
Q6FEM7 NDK_ACIAD Nucleoside diphosphate kinase - <i>Acinetobacter</i> sp	EC 2.7.4.6 NDK NDP kinase Nucleoside-2-P kinase	NDK family.	Metabolismo
Q6F7X1 MDH_ACIAD Malate dehydrogenase - <i>Acinetobacter</i> sp	EC 1.1.1.37	LDH/MDH superfamily. MDH type 2 family.	Metabolismo
A3M928 MDH_ACIBT Malate dehydrogenase - <i>Acinetobacter baumannii</i>	EC 1.1.1.37	LDH/MDH superfamily. MDH type 2 family.	Metabolismo
Q7NS84 NDK_CHRVO Nucleoside diphosphate kinase - <i>Chromobacterium violaceum</i>	EC 2.7.4.6 NDK NDP kinase Nucleoside-2-P kinase	NDK family	Metabolismo
Q6FCM6 Q6FCM6_ACIAD Putative cold shock protein. - <i>Acinetobacter</i> sp	NE	CSD (cold-shock) domain.	Estresse

NE= não encontrado na base de dados (UniProtKB/TrEMBL).

As proteínas Ftsz têm participação direta na “citocinética microbiana”, sendo essenciais para a divisão por serem responsáveis pela invaginação e septação da parede celular (Rothfield *et al.*, 1991). Sob condições adversas (estresse celular) essas proteínas podem regular a fase vegetativa, podendo gerar endósporos como estruturas de resistência visando a perpetuação da espécie quando as condições ambientais forem favoráveis (Bradford & Court, 1998).

Como esperado no solo contaminado por metais pesados prevaleceram as superóxido dismutases e algumas metabólicas específicas, as nucleosídeo difosfato

quinases (família NDK) e as serina hidroximetil transferases (SHMT). Os metais pesados uma vez no ambiente intracelular possuem um elevado potencial oxidativo que pode danificar inúmeras macromoléculas. O principal sistema de defesa contra danos oxidativos é a síntese de superóxido dismutases (Fridovich, 1995). Os radicais superóxidos (O_2^-) que são produzidos em reações de oxido-reduções dos metais pesados com moléculas celulares são capturados pelas superóxido dismutases gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , como exemplificado na reação abaixo), que são retirados da célula por meio de catalases e peroxidases (tais como glutathione peroxidase, GSH; McCord *et al.*, 1971).



Existem três classes de superóxido dismutases: a SodA que é uma citoplasmática Mn-SOD; a SodB que é uma Fe-SOD, também citoplasmática e a SodC que é uma periplasmática Cu/Zn-SOD (Gardner & Fridovich, 1991), sendo que todas essas classes estão envolvidas no sistema de defesa celular contra estresse oxidativo (Seib *et al.*, 2006). Além das superóxido dismutases também foi verificado a presença de nucleosídeo difosfato quinase (NDK). As NDKs catalizam a transferência do grupamento fosfato terminal de nucleosídeos tri-fosfato (NTP) a nucleosídeos di-fosfato (NDP). As NDKs são importantes na resposta contra estresses oxidativos por interagirem diretamente com chaperonas, atuando como proteína acessória (Leung & Hightower, 1997). Além disso, sob estresse oxidativo uma grande quantidade de H_2O_2 é gerado necessitando que catalases sejam expressadas para sua eliminação (Hampton *et al.*, 1998). A transcrição das catalases é regulada por fosforilação, assim as NDKs mediam a transferência de grupamentos fosfatos controlando a biosíntese das catalases (Yoshida & Hasunuma, 2004).

O metabolismo de proteínas pode ser dividido em três fases: metabolismo de carboidratos, metabolismo nucleotídeos e metabolismo de amino ácidos. Desta forma, precedendo a síntese de novas proteínas, requeridas sob situação de estresse, é necessário a biossíntese de amino ácidos. A serina hidrometil transferase (SHMT) catalisa a conversão de serina e tetrahidrofolato para formar glicina e 5,10-metileno tetrafolato que será precursor da biossíntese de nucleotídeos e metionina (Vatsyayan & Roy, 2007; Huang *et al.*, 2007).

A análise dos grupos funcionais do solo contaminado com hidrocarbonetos revelou 3 principais grupos envolvidos na resistência: as proteínas de transporte (superfamília ABC), os fatores de elongação Tu (EF-Tu), e entre as metabólicas destacaram-se NDKs e as argininas deiminases.

Quanto a tolerância a hidrocarbonetos, as proteínas podem ser divididas em 4 principais grupos funcionais: proteínas de degradação (capacidade de utilizá-los como única fonte de carbono), proteínas do metabolismo (Arginina deiminase), proteínas de transporte e proteínas de síntese proteica (Segura *et al.*, 2005). Muitos microrganismos que não possuem a capacidade de degradação de hidrocarbonetos podem ser resistentes por se utilizarem dos outros mecanismos acima relacionados. Na carência de genes que confirmam a capacidade de degradação é necessário ativar mecanismos que possibilitem a geração de energia adicional. Em consonância a demanda de energia são induzidas proteínas que permitam a entrada de açúcares na célula, por meio do sistema de transporte da superfamília ABC (Ramos *et al.*, 1997).

A demanda de energia está principalmente relacionada à extrusão dos hidrocarbonetos por este sistema transporte, que impede que ocorra uma saturação destes compostos no citoplasma e também, não menos importante, pelo grande aumento na síntese de novas proteínas. Para garantir a demanda extra de energia pode ser acionada a rota metabólica da arginina deiminase, que gera 1 mol de ATP por 1 mol de L-arginina (Thauer *et al.*, 1977) conforme ilustrado na Figura 16. As proteínas do fator de elongação Tu são responsáveis pela condução apropriada dos códons, guiando o aminacil-tRNA ao correto aminoacil do ribossomo, para suprir a biosíntese proteica (Miller & Weissbach, 1977).

Fatores de elongação Tu citoplasmáticos em condições de estresse podem ser translocados para o espaço periplasmático, onde podem ter uma função semelhante a uma molecular chaperona (Berrier *et al.*, 2000). Devido aos coeficientes de partição a grande maioria dos hidrocarbonetos afetam as proteínas periplasmáticas, e um aumento na síntese de EF-Tu pode estar relacionado ao seu papel de chaperona no periplasma (Segura *et al.*, 2005).

No solo contaminado por defensivos agrícolas as chaperonas e fatores de elongação Tu, com participação ativa reconhecida na resposta a estresse ambiental (já discutidos anteriormente), foram as proteínas predominantes entre as identificadas.

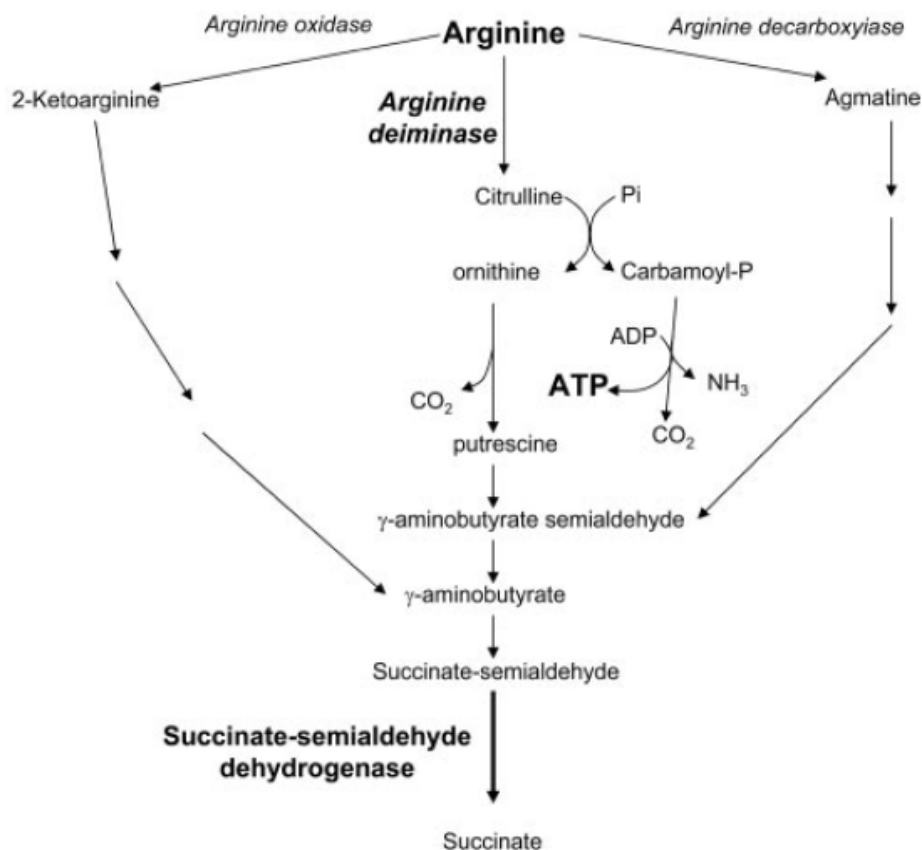


Figura 16. Rota metabólica de arginina deiminase. Fonte: Segura *et al.*, 2005.

Além destas foram identificadas proteínas metabólicas com participação ativa em resposta a estresses, tais como peptidil-prolil isomerases (PPIase) e alquil hidropéroxido redutases (AHse), e de degradação (catecol-1,2-dioxigenase).

A PPIase é uma pequena proteína que faz parte do sistema “Heat Shock Stress” por estar diretamente envolvida na criação ou restauração da conformação funcional das proteínas (Macario & Macario, 2000a). Esta proteína é responsável por realizar o dobramento conformacional de cadeias de polipeptídeos através de ligações rotacionais peptidil-prolil. Espontaneamente essas ligações ocorrem muito lentamente, assim, as

PPlases catalisam tais reações tornando-as compatíveis com outras atividades celulares (Vorob'eva, 2004). Desta forma, esta proteína tem atividade semelhante a chaperonas que pode dar conformação a proteínas parcialmente desnaturadas (Macario & Macario, 2000b).

A alquil hidroperoxido redutase é uma tioredoxina peroxidase da família das peroxiredoxinas (Nguyen-nhu & Knoop, 2002). As Tiorredoxinas peroxidases são enzimas fundamentais na redução de peróxidos de hidrogênio e alquil hidroperoxidos, que possuem alto potencial para danificar moléculas de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (Park *et al.*, 2000). Juntamente com as superóxido dismutases e catalases formam o principal mecanismo de resposta ao estresse oxidativo (Hungria *et al.*, 2004).

A catecol-1,2-dioxigenase é uma enzima envolvida no metabolismo bacteriano de compostos aromáticos. Como toda dioxigenase catalisa a reação de hidroxilação do anel aromático, requerendo cofatores NADH ou NADPH (Haigler & Gibson, 1990). Esta enzima é conhecida como intradiol por realizar a quebra da ligação entre os átomos de carbono ligados aos dois grupos hidroxila do catecol (na via orto), para dar lugar a formação do ácido cis-cis mucônico e daí succinato e acetil-coenzima A (Chapman, 1972).

As análises detalhadas dos principais grupos funcionais identificados demonstraram uma grande variedade de proteínas envolvidas direta ou indiretamente nos mais diversos mecanismos de resposta ao estresse. Algumas das proteínas como por exemplo, transportadoras da família ABC, Superóxido dismutases, EF-Tu, foram identificadas em mais de um spot no mesmo 2D-PAGE. Em estudos de cultura pura, tais resultados poderiam ser atribuídos a proteólise, modificações pós-traducionais ou isoformas de proteínas. A proteólise é pouco provável que tenha ocorrido visto que foram utilizados inibidores de proteases durante todo processo de extração e limpeza dos extratos (Benndorf *et al.*, 2007). Além disso, a presença de proteínas de alto peso molecular presente em todos os géis descartam tal hipótese. Modificações pós traducionais não foram verificadas durante as análises de espectrometria de massas. Assim, é muito provável que isto seja inerente a estudos metaproteômicos, onde variantes de uma mesma proteína com mesma função, porém de origem genética distinta

possa ser detectado (Lo *et al.*, 2007). A comprovação que se trata de isoenzimas de diferentes origens genéticas foi confirmada pela substituição de amino-ácidos em alguns peptídeos, após o ajuste das regiões homólogas. Resultados semelhantes em estudos metaproteômicos foram obtidos por Lacerda *et al.*, 2007; Benndorf *et al.*, 2007 e Lo *et al.*, 2007.

Segundo Tyers e Mann (2003), a abundância de proteínas intracelular pode variar de 1 a 10^6 cópias, reduzindo muito a possibilidade de detecção daquelas que estão pouco expressadas. Embora, de uma visão geral possa ser considerado que apenas uma pequena fração das proteínas presentes nas amostras foi detectada pela limitação da técnica, esta reflete a presença e atividade de diferentes grupos taxonômicos e demonstra o “*fingerprint*” proteômica dos microrganismos do solo frente aos contaminantes.

Por fim, ao nosso conhecimento até o presente momento, com base na literatura internacional, este é o primeiro trabalho de desenvolvimento de um protocolo de extração direta de proteínas de solos contaminados para aplicação em 2D-PAGE. Os resultados demonstram que a metaproteômica surge como uma nova ferramenta com grande potencial para o entedimento da microbiologia ambiental “*in situ*”.

5.4. CONCLUSÕES

- A presença de ácidos húmicos em extratos protéicos inviabiliza sua utilização em estudos metaproteômicos;
- O protocolo desenvolvido para extração direta de proteínas de amostras do solo é robusto e permite alta resolução dos géis 2D-PAGE;
- O mecanismo de resposta ao estresse predominante no estudo foi as chaperonas;
- As proteínas identificadas estão envolvidas em diferentes mecanismos de resposta fisiológica ao estresse;
- A metaproteômica é uma ferramenta que possui alta sensibilidade para revelar alterações na comunidade microbiana exposta a distintos poluentes, possibilitando uma nova abordagem de investigação e a obtenção de conhecimentos até agora totalmente desconhecidos.

5.5 BIBLIOGRAFIA

ALLISON, S. D. Soil minerals and humic acids alter enzyme stability: implications for ecosystem processes. **Biogeochemistry**, v.81, p.361–373. 2006.

AOYAMA, M. Properties of neutral phosphate buffer extractable organic matter on soils revealed using size exclusion chromatography and fractionation with polyvinylpyrrolidone. **Soil Science Plant Nutrition**, v.52, p.378-386. 2006.

BENNDORF, D. *et al.* Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. **International Society for Microbial Ecology**, v.1, p.224-234. 2007.

BERKELMAN, T. *et al.* **Prevention of Vertical Streaking**. Bio-Rad Laboratories, Inc., Alfred Nobel Drive, Hercules, USA. 2000a. www.bio-rad.com.

BERKELMAN, T. *et al.* **Tips to prevent streaking on 2-D gels**. Bio-Rad Laboratories, Inc. Alfred Nobel Drive, Hercules, USA. 2000b. www.bio-rad.com.

BERRIER, C. *et al.* Elongation factor Tu and DnaK are transferred from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli* during osmotic downshock presumably via the mechanosensitive channel MscL. **Journal Bacteriology**, v.182, p.248–251. 2000.

BOOR, K. J. Bacterial stress responses: what doesn't kill them makes them stronger. **PLoS Biol**, v.4, p.18-19. 2006.

BRADFORD, S. P. & COURT, D. L. Control of ftsZ Expression, Cell Division, and Glutamine Metabolism in Luria-Bertani Medium by the Alarmone ppGpp in *Escherichia Coli*. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.5, p.1053–1062. 1998.

CHAO, C. C. *et al.* Using LC-MS with de novo software to fully characterize the multiple methylations of lysine residues in a recombinant fragment of an outer membrane protein from a virulent strain of *Rickettsia prowazekii*. **Biochimica et Biophysica Acta** 1702, p.145–152. 2004.

CHAPMAN, P. J. **Degradation of Synthetic Organic Molecules in the Biosphere**. Washington, D.C.: National Academy of Science, p.17-55. 1972.

CHENU, C. & STOTZKY, G. **Interactions between Microorganisms and Soil Particles: An Overview**. In: HUANG P. M *et al.* (Eds). v.8, p.3-40. IUPAC Series of Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems. Wiley, Chichester, England. 2002.

CRIQUET, S. *et al.* Protein measurement in forest litter. **Biology and Fertility Soils**, v.35, p.307-313. 2002.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review in Biochemistry**. v.64, p.97–112. 1995.

GARDNER, P. R. & FRIDOVICH, I. Superoxide sensitivity of the Escherichia coli 6-phosphogluconate dehydratase. **Journal Biology Chemistry**, v.266, p.1478–1483. 1991.

GEORGOPOULOS, C. & WELCH, W. J. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. **Annual Review Cell Biology**, v.9, p.601–634. 1993.

GIARD, J. C. *et al.* Characterization of genes homologous to the general stress-inducible gene *gls24* in Enterococcus faecalis and Lactococcus lactis. **FEMS Microbiol. Letters**, v.206, p.235–239. 2002.

GRASSO, D. *et al.* Impact of physiological state on surface thermodynamics and adhesion of Pseudomonas aeruginosa, **Environmental Science and Technology**, v.30, pp.3604. 1996.

HAIGLER, B. E. & GIBSON, D. T. Purification and Properties of Ferredoxin NAP, a Component of Naphthalene Dioxygenase from Pseudomonas sp. Strain NCIB 9816. **Journal of Bacteriology**, v.172, p.465-468, 1990.

HAMPTON, M. B. *et al.* Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v.92, p.3007–3017. 1998.

HAZEN, T. C. & STAHL, D. A. Using the stress response to monitor process control: pathways to more effective bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, p.285–290. 2006.

HUANG, Y. J. *et al.* Physiological Response and Protein Expression under Acid Stress of Escherichia coli O157:H7 TWC01 Isolated from Taiwan. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.55, p.7182-7191. 2007.

HUNGRIA M. *et al.* Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v.3, p.102-116. 2004.

KAN, J. *et al.* Metaproteomic analysis of Chesapeake bay microbial communities. **Saline Systems**, v. 1, p.7-19. 2005.

LACERDA, C. M. R. *et al.* Metaproteomic Analysis of a Bacterial Community Response to Cadmium Exposure. **Journal of Proteome Research**, v.6, p.1145-1152. 2007.

LAVIE, S. & STOTZKY, G. Adhesion of the clay minerals, montmorillonite, kaolinite, and attapulgite, reduces respiration of *Histoplasma capsulatum*. **Applied Environmental and Microbiology**, v.51, pp.65. 1986.

LEUNG, S. M. & HIGHTOWER, L. E. A 16-kDa protein functions as a new regulatory protein for Hsc70 molecular chaperone and is identified as a member of the Nm23/nucleoside diphosphate kinase family. **Journal Biological Chemistry**, v.272, p.2607–2614. 1997.

LO, I. *et al.* Strain-resolved community proteomics reveals recombining genomes of acidophilic bacteria. **Nature**, v.446, p.537-541. 2007.

MACARIO, A. J. L & MACARIO, E. C. Stressors, Stress and Survival; Overview. **Frontiers in Bioscience**, v.5, p.780-786, September 1, 2000a.

MACARIO, A. J. L. & MACARIO, E. C. **Chaperone proteins**. In: **The encyclopedia of stress**. (Eds.) G. Fink. Academic Press, CA. p.429-435. 2000b.

MARON, P. A. *et al.* Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology. **Microbiol Ecology**, v. 53, p.486-493. 2007.

MARTIN, J. & HARTL, U. Protein folding in the cell: molecular chaperones pave the way. **Structure**, v. 1, n.3, p.161–164. 1993.

MCBRIDE, M. B. **Environmental Chemistry of Soils**. Oxford University Press, New York, pp.416. 1994.

MCCORD, J. M. *et al.* An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. **Procedis National Academy Science**. USA. v.68, p.1024–1027. 1971.

MILLER, D. L. & WEISSBACH, H. **Factors involved in the transfer of aminoacyl-tRNA to the ribosome**,. In S. Pestka and H. Weissach (Eds.) *Molecular mechanisms of protein biosynthesis*. Academic Press, Inc., New York, N.Y. p.323–373. 1977.

MONAHAN, I. M. *et al.* Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. **Microbiology**, v.147, p.459–471. 2001.

MÜNCHBACH, M. *et al.* Proteome analysis of heat shock protein expression in *Bradyrhizobium japonicum*. **European Journal Biochemistry**, v.264, p.39–48. 1999.

NARBERHAUS, F. *et al.* RNA thermometers. **FEMS Microbiol Review**, v.30, p.3-16. 2006.

NGUYÊN-NHU, N. T. & KNOOPS, B. Alkyl hydroperoxide reductase 1 protects *Saccharomyces cerevisiae* against metal ion toxicity and glutathione depletion. **Toxicology Letters**, v.135, p.219-228. 2002.

OGUNSEITAN, O. A. Direct extraction of proteins from environmental samples. **Journal Microbiology Methods**, v.17, p.273-281. 1993.

OGUNSEITAN, O.A. Soil Proteomics: Extraction and Analysis of Proteins from Soil. **Soil Biology**, v.8, p.95-115, 2006.

PARK, S.G. *et al.* Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae* . **Journal Biological Chemistry**. v.275, p.5723-5732. 2000.

QUIQUAMPOIX, H. & RATCLIFFE, R. G. A ^{31}P NMR study of the adsorption of bovine serum albumin on montmorillonite using phosphate and the paramagnetic cation Mn^{2+} : modification with pH. **Colloid Interface Science**, v.148, pp.343. 1992.

QUIQUAMPOIX, H. *et al.* Mechanisms and consequences of protein adsorption on soil mineral surfaces, **ACS Symp. Ser.**, v.602, pp.321. 1995.

QUIQUAMPOIX, H. Mechanisms of protein adsorption on surfaces and consequences for extracellular enzyme activity in soil. In *Soil Biochemistry*; Bollag, J. M., Stotzky, G., (Eds). Marcel Dekker: New York, v. 10, p. 171-206. 2000.

RABILLOUD T (Eds), **Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods**, Springer-Verlag, pp. 104. 2000.

RABILLOUD, T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. **Electrophoresis**, v.17, p.813-829. 1996.

RAMOS, J. L. *et al.* Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. **Journal Biological Chemistry**, v.272, p.3887–3890. 1997.

ROTHFIELD, L. I. *et al.* Biogenesis of the Escherichia coli cell division system. Cold Spring Harbor Symp. **Quantitative Biology**. v.56, p.751–756. 1991.

RUGGIERO, P. *et al.* Soil as a catalytic system. In **Soil Biochemistry**, v.9, (Eds). STOTZKY, G. *et al.* New York, pp.79. 1996.

SANDERS, J. *et al.* Environmental stress responses in Lactococcus lactis. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, n.4, p.483–501. 1999

SCHULZE, W *et al.* Environmental proteomics – what proteins from soil and surface water can tell us: a perspective. **Biogosciences Discussions**, v.1, p.195-218, 2004a.

SCHULZE, W *et al.* Proteins analysis in dissolved organic matter: what free proteins from soil leachate and surface water can tell us – a perspective. **Biogosciences Discussions**, v.1, p.825-853, 2004b.

SEGURA, A. *et al.* Proteomic Analysis Reveals the Participation of Energy- and Stress-Related Proteins in the Response of Pseudomonas putida DOT-T1E to Toluene. **Journal of Bacteriology**, v.187, no.17, p.5937–5945. 2005.

SEIB, K. L. *et al.* Investigation of oxidative stress defenses of Neisseria gonorrhoeae by using a human polymorphonuclear leukocyte survival assay. **Infection Immunology**. v.73, p.5269–5272. 2006.

SINGLETON, I. *et al.* The potential of soil protein-based methods to indicate metal contamination. **Applied Soil Ecology**, v.23, p.25-32. 2003.

TABB, D. L. *et al.* DTASelect and Contrast: tools for assembling and comparing protein identifications from shotgun proteomics, **Journal Proteome Research**. v.1, p.21– 26. 2002.

TEDESCO, M.J. *et al.* **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 174p. 1995.

THAUER, R. K. *et al.* Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. **Bacteriology Reviews**, v.41, p.100–180. 1977.

TYERS, M. & MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, v.422, p.193-197. 2003.

VATSYAYAN, R. & ROY, U. Molecular cloning and biochemical characterization of *Leishmania donovani* serine hydroxymethyltransferase. **Protein Expression and Purification**, v.52, p.433–440. 2007.

VOROB'EVA, L. I. Stressors, Stress Reactions, and Survival of Bacteria: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.40, n.3, p.217–224. 2004. Translated from **Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya**, v.40, n.3, p.261–269. 2004.

WANG, W. *et al.* Protein extraction for two dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of interfering compounds. **Electrophoresis**, v.24, p.2369-2375. 2003.

WILMES, P. & BOND, P.L. Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. **TRENDS in Microbiology**, v.14, n.2, p.92-97, 2006.

WINKLER, W. C. Metabolic monitoring by bacterial mRNAs. **Archives in Microbiology**, v.183, p.151-159. 2005.

WRIGHT, J. M. & LEWIS, R. J. Stress responses of bacteria. **Current Opinion in Structural Biology**, v.17, p.755–760. 2007.

YOSHIDA, Y. & HASUNUMA, K. Reactive oxygen species affect photomorphogenesis in *Neurospora crassa*. **Journal Biological Chemistry**, v.279, p.6986–6993. 2004.

ZHAO, B. & POH, C. L. Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics. **Proteomics**, v.8, DOI 10.1002/pmic.200701005. 2008.

5.6 APÊNDICES

Apêndice 1

Proteomweaver Gel Match Report

Experiment: Demonstration Experiment

● Gel1: Solo control 2.id436.tif (width = 2322, height = 2328, num. spots = 2078)

● Gel2: Solo control 3.id437.tif (width = 2328, height = 2322, num. spots = 1977)

Number of matches: 1411

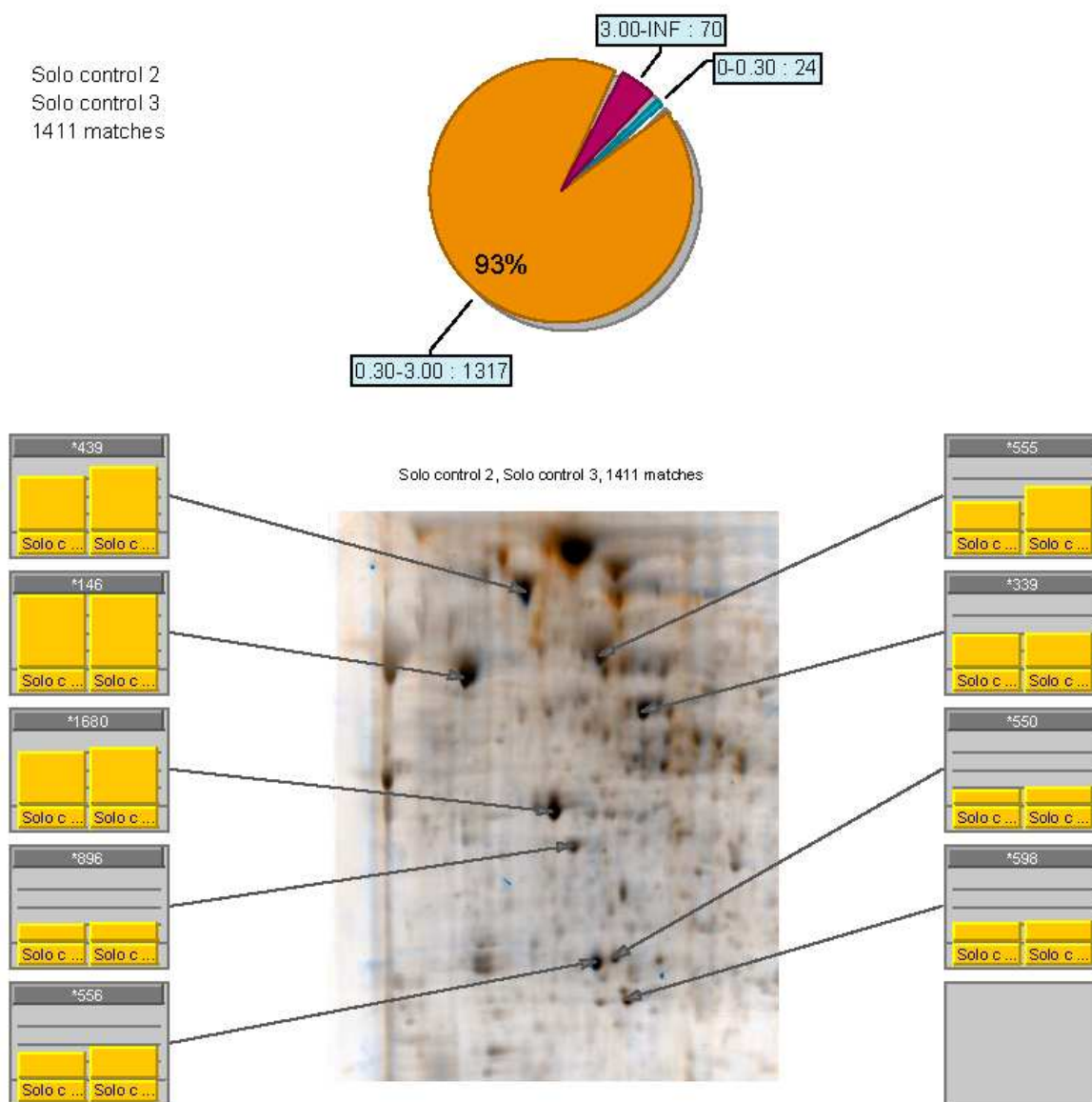


Figura 17. Análise de similaridade entre repetições do solo controle (géis sobrepostos pelo software). As setas indicam os spots que foram selecionados para espectrometria de massas. Os gráficos de barras demonstram as intensidades dos spots.

Apêndice 2

Proteomweaver Gel Match Report

Experiment: Demonstration Experiment

● Gel1: Hidro 2.id444.tif (width = 2328, height = 2322, num. spots = 1685)

● Gel2: Hidro 3.id445.tif (width = 2328, height = 2322, num. spots = 1729)

Number of matches: 1197

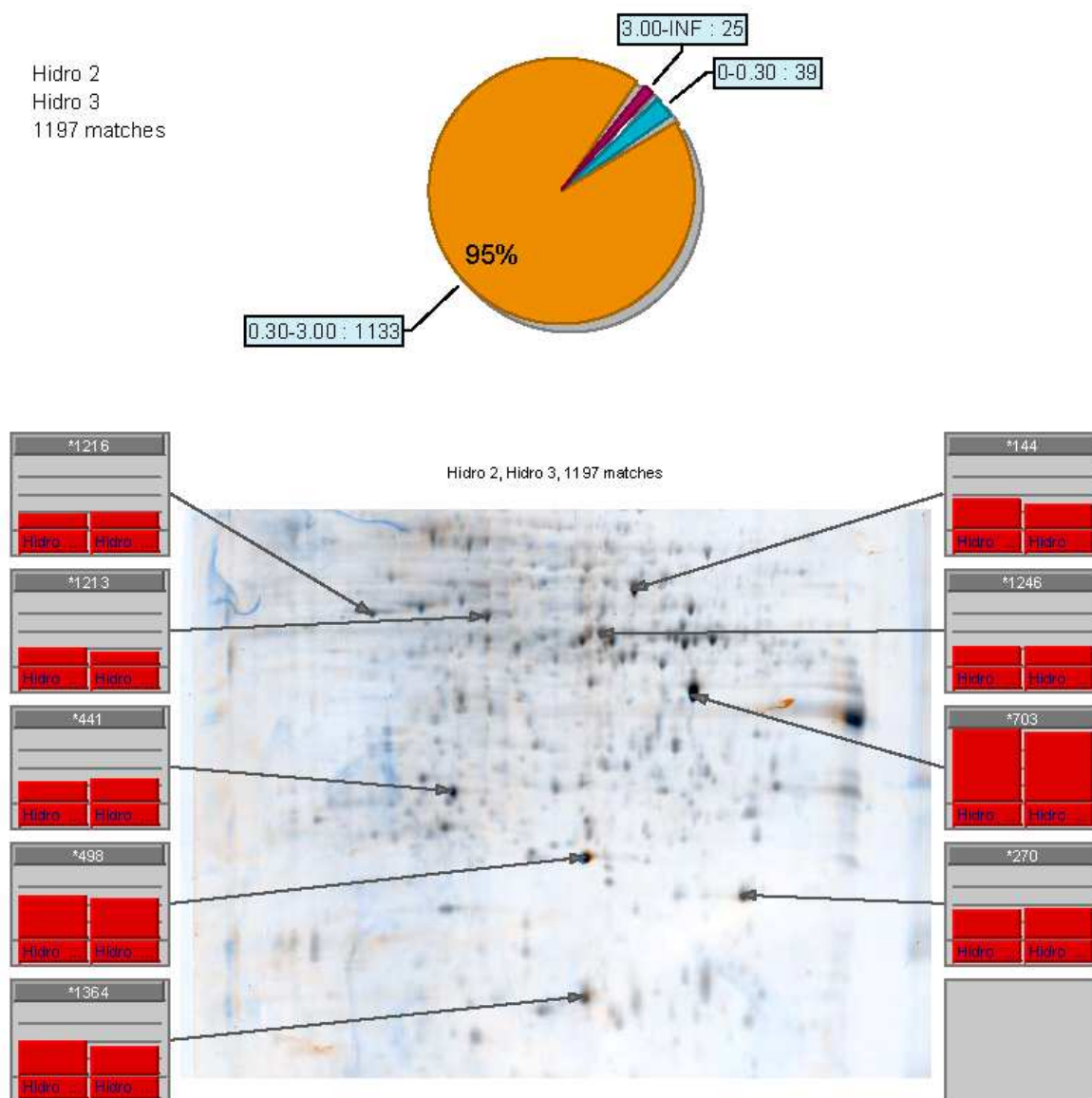


Figura 18. Análise de similaridade entre repetições do solo contaminado com hidrocarbonetos (géis sobrepostos pelo software). As setas indicam os spots que foram selecionados para espectrometria de massas. Os gráficos de barras demonstram as intensidades dos spots.

Apêndice 3

Proteomweaver Gel Match Report

Experiment: Demonstration Experiment

● Gel1: Metais 2.id440.tif (width = 2328, height = 2322, num. spots = 1945)

● Gel2: Metais 3.id441.tif (width = 2328, height = 2322, num. spots = 2044)

Number of matches: 1408

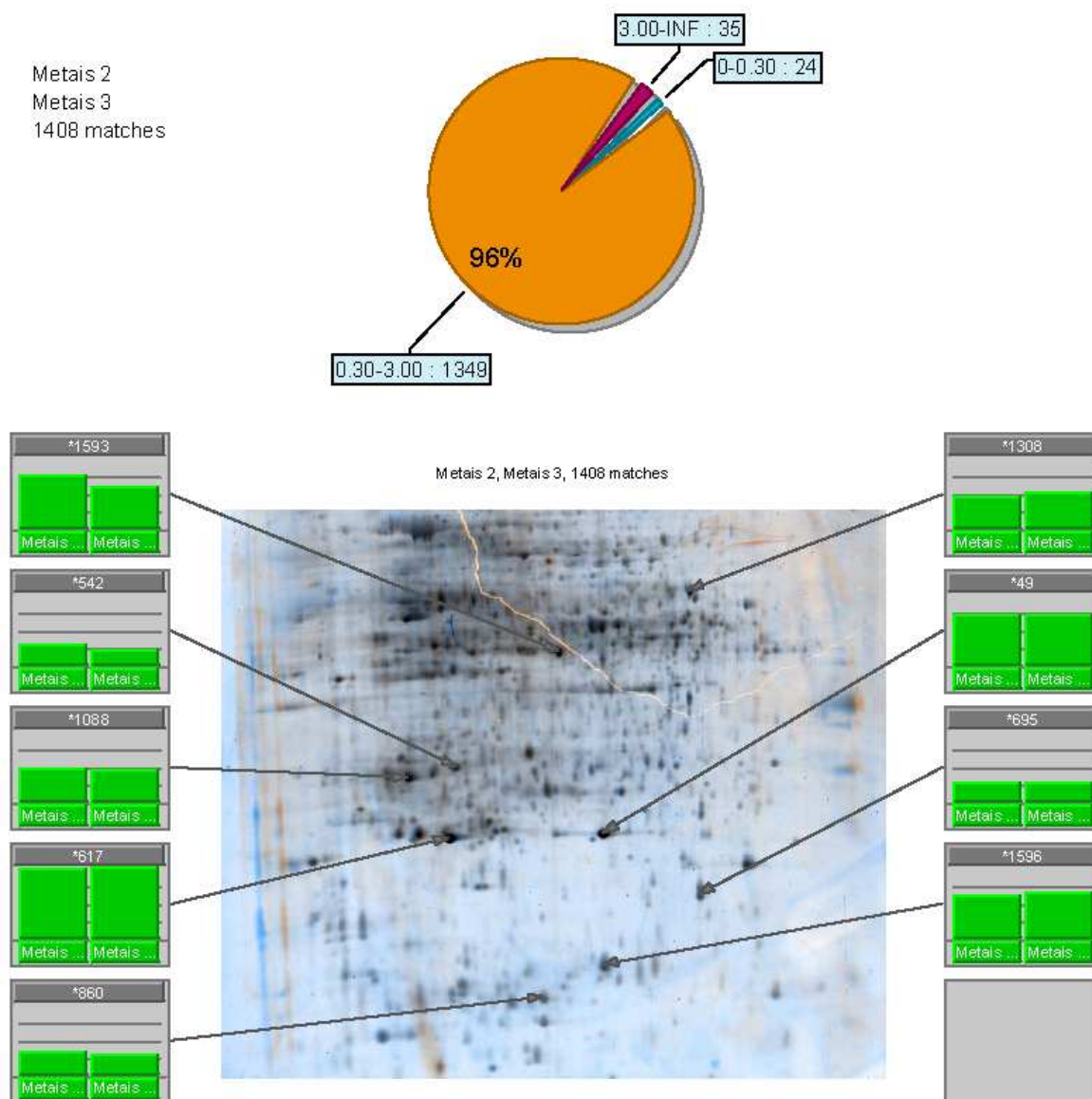


Figura 19. Análise de similaridade entre repetições do solo contaminado com metais pesados (géis sobrepostos pelo software). As setas indicam os spots que foram selecionados para espectrometria de massas. Os gráficos de barras demonstram as intensidades dos spots.

Apêndice 4

Proteomweaver Gel Match Report

Experiment: Demonstration Experiment

● Gel1: Agri 2.id448.tif (width = 2328, height = 2322, num. spots = 1943)

● Gel2: Agri 3.id449.tif (width = 2328, height = 2322, num. spots = 1899)

Number of matches: 1435

Agri 2
Agri 3
1435 matches

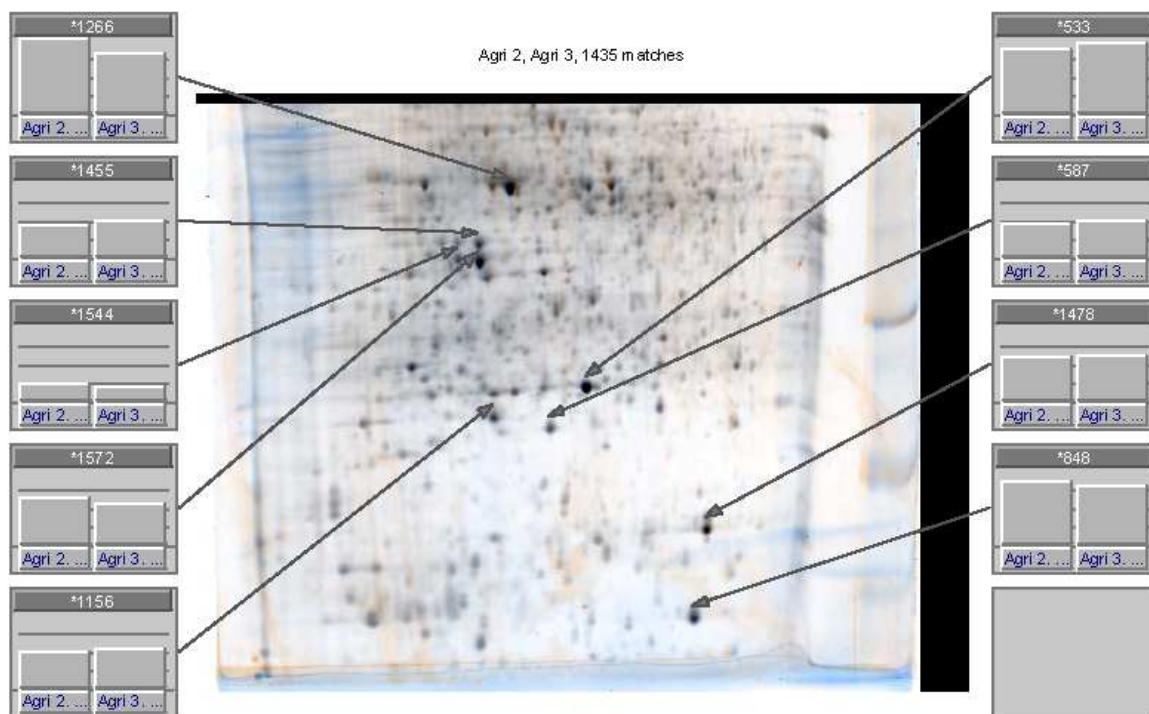
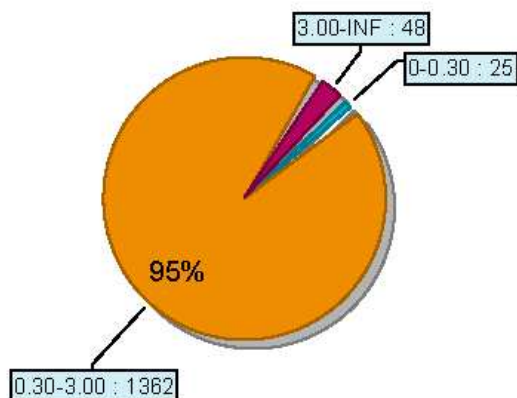


Figura 20. Análise de similaridade entre repetições do solo contaminado com defensivos agrícolas (géis sobrepostos pelo software). As setas indicam os spots que foram selecionados para espectrometria de massas. Os gráficos de barras demonstram as intensidades dos spots.

Apêndice 5

Proteomweaver Gel Match Report

Experiment: Demonstration Experiment

● Gel1: Solo control 1.id435.tif (width = 2184, height = 2170, num. spots = 1489)

● Gel2: Metais 3.id441.tif (width = 2328, height = 2322, num. spots = 2044)

Number of matches: 805

Solo control 1
Metais 3
805 matches

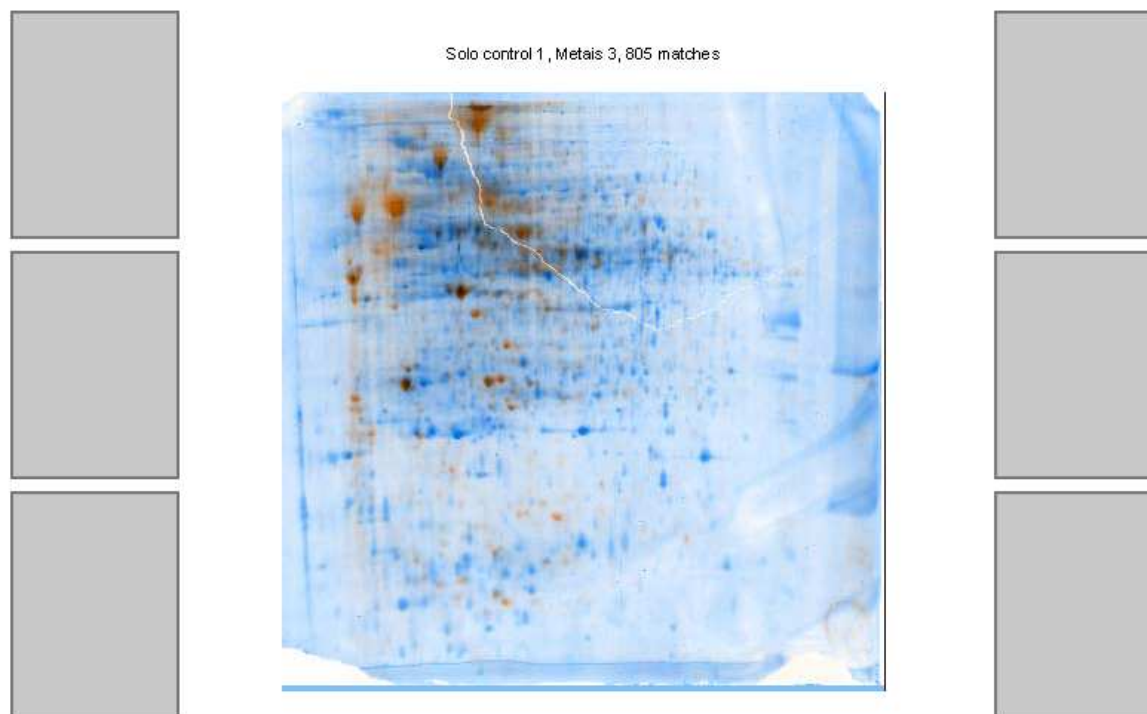
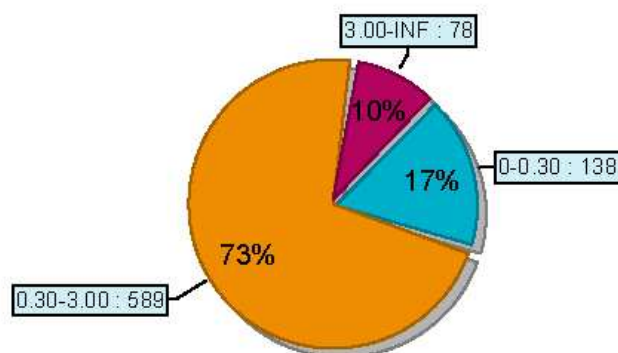


Figura 21. Análise de similaridade entre os solos controle e contaminado com metais pesados.

Apêndice 6

Proteomweaver Gel Match Report

Experiment: Demonstration Experiment

● Gel1: Solo control 1.id435.tif (width = 2184, height = 2170, num. spots = 1489)

● Gel2: Hidro 3.id445.tif (width = 2328, height = 2322, num. spots = 1729)

Number of matches: 745

Solo control 1
Hidro 3
745 matches

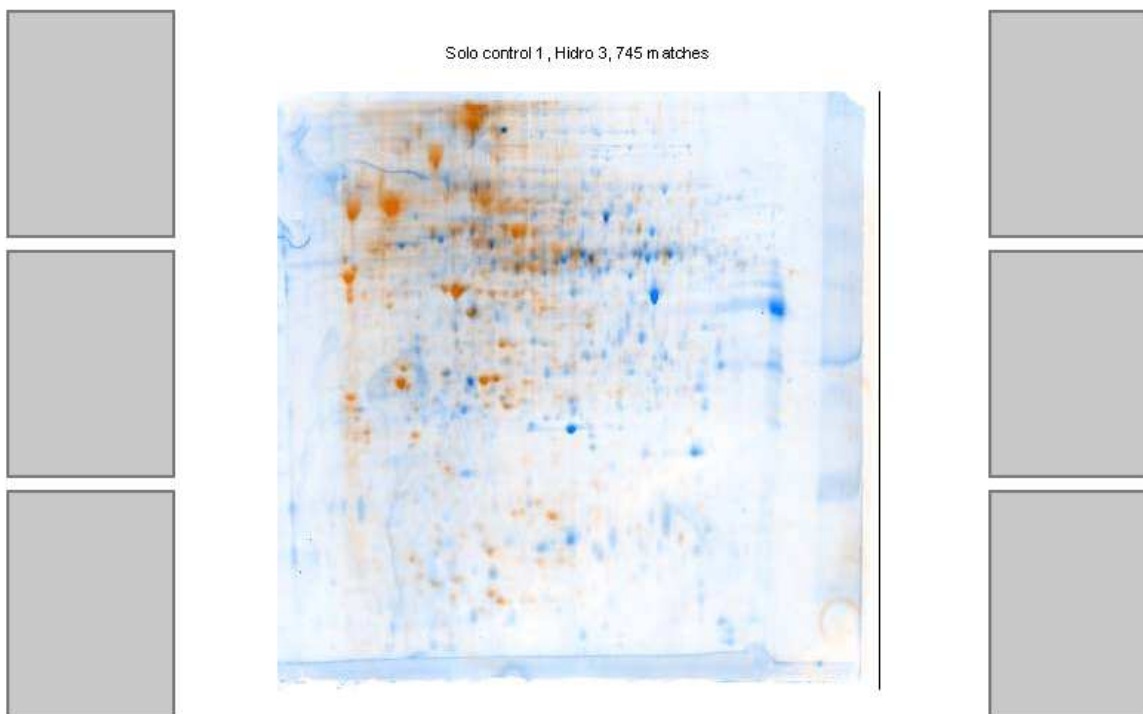
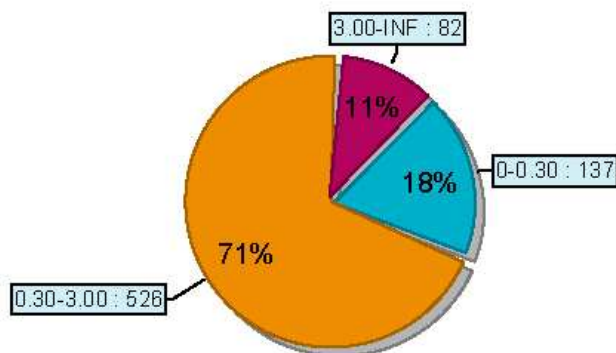


Figura 22. Análise de similaridade entre os solos controle e contaminado com hidrocarbonetos.

Apêndice 7

Proteomweaver Gel Match Report

Experiment: Demonstration Experiment

● Gel1: Solo control 1.id435.tif (width = 2184, height = 2170, num. spots = 1489)

● Gel2: Agri 3.id449.tif (width = 2328, height = 2322, num. spots = 1899)

Number of matches: 814

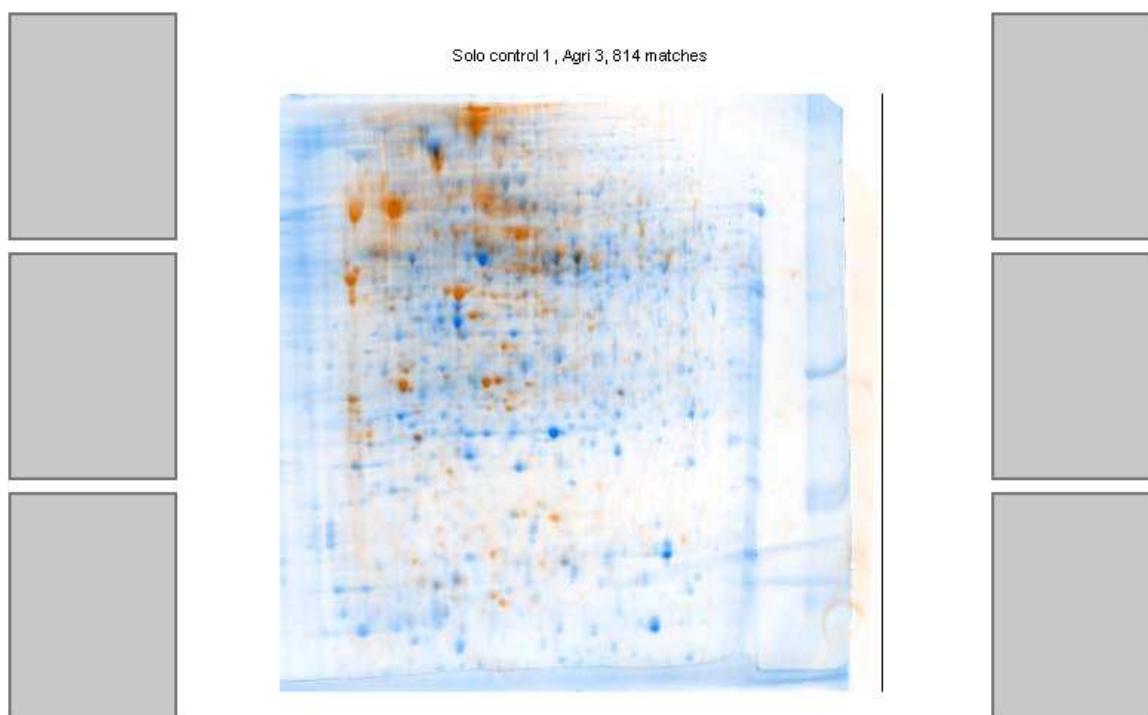
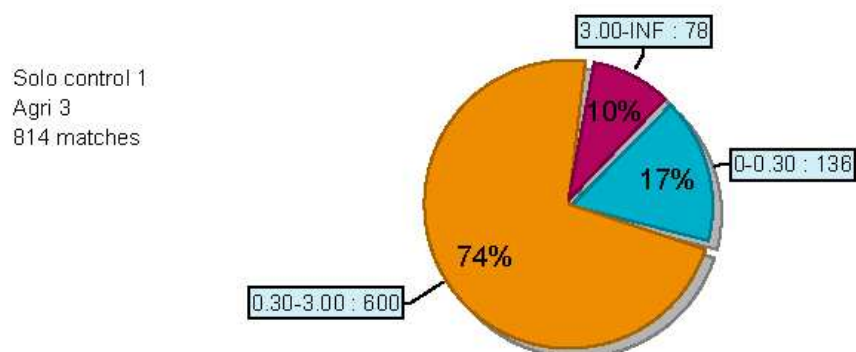


Figura 23. Análise de similaridade entre os solos controle e contaminado com defensivos agrícolas.

Apêndice 8

Proteomweaver Gel Match Report

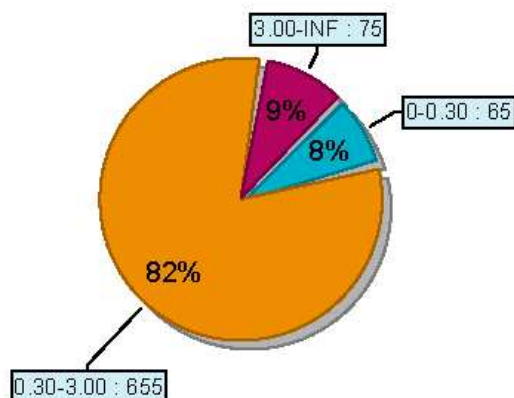
Experiment: Demonstration Experiment

● Gel1: Metais 1.id439.tif (width = 2184, height = 2170, num. spots = 1559)

● Gel2: Hidro 3.id445.tif (width = 2328, height = 2322, num. spots = 1729)

Number of matches: 795

Metais 1
Hidro 3
795 matches



Metais 1, Hidro 3, 795 matches



Figura 24. Análise de similaridade entre os solos contaminados com metais pesados e hidrocarbonetos.

Apêndice 9

Proteomweaver Gel Match Report

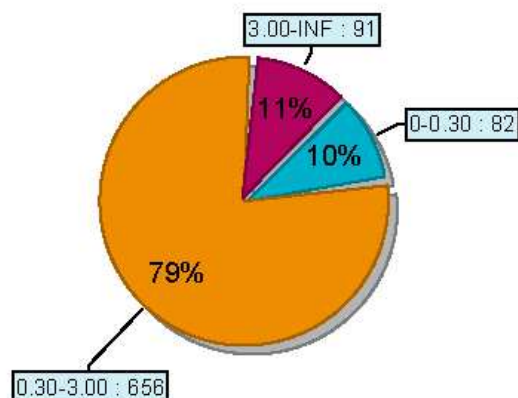
Experiment: Demonstration Experiment

● Gel1: Metais 1.id439.tif (width = 2184, height = 2170, num. spots = 1559)

● Gel2: Agri 3.id449.tif (width = 2328, height = 2322, num. spots = 1899)

Number of matches: 829

Metais 1
Agri 3
829 matches



Metais 1, Agri 3, 829 matches

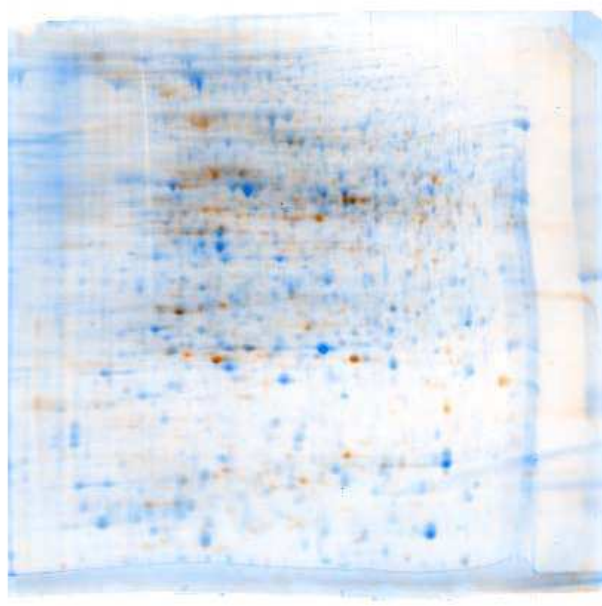


Figura 25. Análise de similaridade entre os solos contaminados com metais pesados e defensivos agrícolas.

Apêndice 10

Proteomweaver Gel Match Report

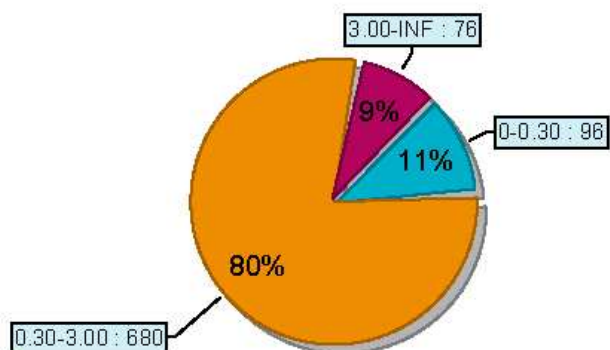
Experiment: Demonstration Experiment

● Gel1: Hidro 1.id443.tif (width = 2184, height = 2170, num. spots = 1798)

● Gel2: Agri 3.id449.tif (width = 2328, height = 2322, num. spots = 1899)

Number of matches: 852

Hidro 1
Agri 3
852 matches



Hidro 1, Agri 3, 852 matches

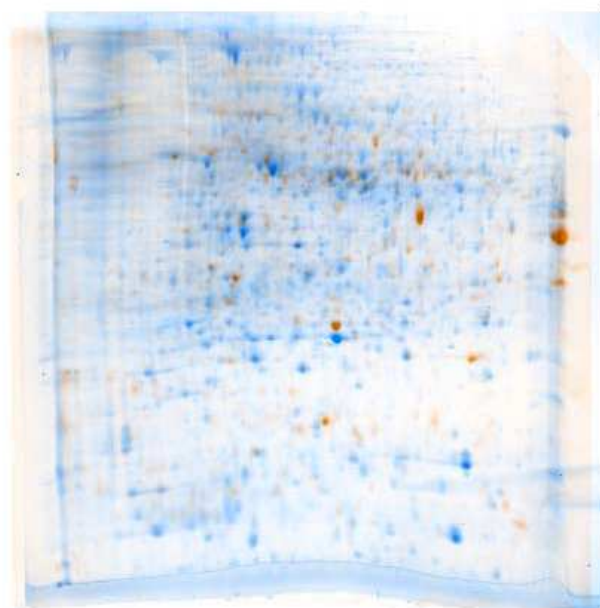


Figura 26. Análise de similaridade entre os solos contaminados com hidrocarbonetos e defensivos agrícolas.

Apêndice 11

Tabela 8. Identificação de proteínas extraídas do solo controle.

Spot	Peptídeo	MH+	Xc	ΔCn	Proteína
Spot 3	R.AAVEEGVVPGGGVALVR.A	1579.88	5.03	0.3	Q0VRW6 CH60_ALCBS 60 kDa chaperonin - Alcanivorax borkumensis
Spot 3	R.KEIENSSSDYDKEK.L	1671.77	2.72	0.4	Q0VRW6 CH60_ALCBS 60 kDa chaperonin - Alcanivorax borkumensis
Spot 3	K.EIENSSSDYDKEK.L	1543.68	2.63	0.3	Q0VRW6 CH60_ALCBS 60 kDa chaperonin - Alcanivorax borkumensis
Spot 3	R.AAVEEGIVPGGGVTLLR.A	1637.92	4.88	0.3	Q0VRW6 CH60_ALCBS 60 kDa chaperonin - Alcanivorax borkumensis
Spot 3	K.KQIEDSSSDYDKEK.L	1671.77	3.20	0.2	Q3KMQ9 CH60_CHLTA 60 kDa chaperonin - Chlamydia trachomatis
Spot 3	K.QIEDSSSDYDKEK.L	1543.68	3.09	0.1	Q3KMQ9 CH60_CHLTA 60 kDa chaperonin - Chlamydia trachomatis
Spot 3	K.DKFENM*GAQM*VK.E	1429.65	4.06	0.2	A1K436 A1K436_AZOSB 60 kDa chaperonin. - Azoarcus sp
Spot 3	K.DKFENMGAQM*VK.E	1413.65	3.61	0.3	A1K436 A1K436_AZOSB 60 kDa chaperonin. - Azoarcus sp
Spot 3	R.M*VAGVNVLANAVK.V	1301.72	2.98	0.3	A1K436 A1K436_AZOSB 60 kDa chaperonin. - Azoarcus sp
Spot 3	R.MVAGVNVLANAVK.V	1285.73	2.95	0.3	A1K436 A1K436_AZOSB 60 kDa chaperonin. - Azoarcus sp
Spot 3	R.GLEDELVVVEGM*QFDR.G	1867.84	5.21	0.3	A1U292 A1U292_MARAV 60 kDa chaperonin. - Marinobacter aquaeolei
Spot 3	K.VGAGSEVEM*KEK.K	1279.62	3.65	0.4	A1U292 A1U292_MARAV 60 kDa chaperonin. - Marinobacter aquaeolei
Spot 3	R.VAKLAGGVAVIKVGAGSEVEM* K.E	2129.20	3.62	0.5	A1U292 A1U292_MARAV 60 kDa chaperonin. - Marinobacter aquaeolei
Spot 3	K.EGVITVEEGR.G	1088.56	3.48	0.1	A1U292 A1U292_MARAV 60 kDa chaperonin. - Marinobacter aquaeolei
Spot 3	R.ELLPVLESVAK.A	1197.71	2.69	0.2	Q8CWJ0 CH602_VIBVU 60 kDa chaperonin 2 - Vibrio vulnificus
Spot 3	K.GIEDELVVVEGM*QFDR.G	1867.84	5.21	0.3	Q17VC6 Q17VC6_HELAH 60 kDa chaperonin. - Helicobacter acinonychis
Spot 4	R.GLAYAPYADLIWCETSK.P	1957.94	5.10	0.4	Q9K9H0 ACEA_BACHD Isocitrate lyase - Bacillus halodurans
Spot 4	K.M*LAYNCSPSFNWK.K	1633.71	4.50	0.2	Q1IHE4 Q1IHE4_ACIBL Isocitrate lyase - Acidobacteria bacterium
Spot 4	K.MLAYNCSPSFNWK.K	1617.72	4.32	0.4	Q1IHE4 Q1IHE4_ACIBL Isocitrate lyase - Acidobacteria bacterium
Spot 4	K.VAM*VYGQM*NEPPGNNR.L	1694.76	4.34	0.4	A1TJ41 A1TJ41_ACIAAC ATP synthase F1, beta subunit - Acidovorax avenae subsp. citrulli
Spot 4	K.VGLFGGAGVGK.T	961.55	3.47	0.3	A1TJ41 A1TJ41_ACIAAC ATP synthase F1, beta subunit - Acidovorax avenae subsp. citrulli
Spot 4	K.VLLPTQNAVR.N	1110.66	2.51	0.2	Q8ENS3 Q8ENS3_OCEIH Isocitrate lyase - Oceanobacillus iheyensis
Spot 4	K.MLSYNCSPSFNWK.K	1633.71	3.84	0.3	Q0BDY7 Q0BDY7_BURCM Isocitrate lyase - Burkholderia cepacia

Spot	Peptídeo	MH+	Xc	ΔCn	Proteína
Spot 4	R.DVLLFVDNIYR.Y	1366.74	3.27	0.3	Q6FFK0 ATPB_ACIAD ATP synthase subunit beta - <i>Acinetobacter</i> sp
Spot 5	R.GLGAGANPEVGKK.A	1197.66	3.20	0.3	A7Z4E9 A7Z4E9_BACA2 FtsZ. - <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Spot 6	R.VAIDALAVFVHK.D	1282.75	3.80	0.3	Q486R2 Q486R2_COLP3 Putative phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-bi - <i>Colwellia psychrerythraea</i>
Spot 7	K.TPILGLDVWEHAYYLNQNR.R	2465.22	7.03	0.6	Q9KD10 SODM_BACHD Superoxide dismutase [Mn] - <i>Bacillus halodurans</i>
Spot 7	K.FGSFADFKEEFAK.A	1522.72	4.18	0.4	A0RIP9 A0RIP9_BACAH Superoxide dismutase, Mn - <i>Bacillus thuringiensis</i>
Spot 8	K.TPVLGLDVWEHAYYLNQNR.R	2451.21	6.61	0.3	A0RIP9 A0RIP9_BACAH Superoxide dismutase, Mn - <i>Bacillus thuringiensis</i>
Spot 9	K.SCVTNFGSGWTWLVK.K	1741.84	5.91	0.5	A4G7Y8 A4G7Y8_HERAR Superoxide dismutase, iron - <i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>

MH+=valores de dipeptídeos; **Xc**= correlação cruzada; **ΔCn**= Correlação normalizada.

Apêndice 12

Tabela 9. Identificação de proteínas extraídas s do solo contaminado por metais pesados (S1).

Spot	Peptídeo	MH+	Xc	ΔCn	Proteína
Spot 1	K.VGDVVIFNEGYGVK.S	1495.78	4.49	0.1	A3N121 A3N121_ACTP2 10 kDa chaperonin. - <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serotype
Spot 1	R.ILENGTVKPLDVK.V	1425.83	4.42	0.2	A3D8X0 A3D8X0_SHEB5 10 kDa chaperonin. - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 1	R.LLENGTVKPLDVK.V	1425.83	4.42	0.2	Q12S62 Q12S62_SHEDO 10 kDa chaperonin. - <i>Shewanella denitrificans</i>
Spot 2	R.ADFAESIDANAVHGSDSEAAAAAR.E	2275.02	6.49	0.5	Q1IEI5 Q1IEI5_PSEE4 Nucleoside diphosphate kinase - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 2	R.EIAYFFAATEVTTR	1618.81	5.16	0.5	Q1IEI5 Q1IEI5_PSEE4 Nucleoside diphosphate kinase - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 2	K.AEAEGFYAEHSER.G	1495.64	4.22	0.4	Q4K6U5 NDK_PSEF5 Nucleoside diphosphate kinase - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Spot 2	R.TFSIIKPDAAVAK.N	1289.75	3.33	0.4	A0LBZ0 A0LBZ0_MAGSM Nucleoside diphosphate kinase - <i>Magnetococcus</i> sp
Spot 2	K.LAAELAAANLR.A	1112.64	3.71	0.2	A3D8Q2 A3D8Q2_SHEB5 Ribosomal protein L9. - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 3	R.FNDFSGDFSYYDAAKPTAAK.V	2051.93	5.90	0.5	A3D710 A3D710_SHEB5 Ycel family protein - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 3	R.FNDFSGDFSYYDAAK.P	1583.66	4.87	0.4	A3D710 A3D710_SHEB5 Ycel family protein - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 3	K.FAQATFTSTTVEDK.G	1545.74	4.60	0.5	A3D710 A3D710_SHEB5 Ycel family protein - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 3	K.VSHLGYSYVVGGR.F	1336.70	3.98	0.4	A3D710 A3D710_SHEB5 Ycel family protein - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 3	K.M*DLGPASSHVELDLVVEGVR.K	2139.08	3.87	0.4	A3D710 A3D710_SHEB5 Ycel family protein - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 3	R.AGFTGTTTFAM*K.D	1248.59	3.82	0.3	A3D710 A3D710_SHEB5 Ycel family protein - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 3	R.EGAHASITFK.V	1060.54	2.13	0.1	A3D710 A3D710_SHEB5 Ycel family protein - <i>Shewanella baltica</i>

Spot	Peptídeo	MH+	Xc	ΔCn	Proteína
Spot 3	K.VNVTNTLSVDSNHAER.D	1854.93	5.88	0.3	A6WQU7 A6WQU7_SHEB8 Ycel family protein - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 4	K.TSVGTFGSGWGWLVK.K	1581.81	4.33	0.4	Q02H75 Q02H75_PSEAB Superoxide dismutase - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Spot 4	K.ETLEYHHDK.H	1171.54	2.68	0.3	Q6FCJ6 Q6FCJ6_ACIAD Superoxide dismutase [Fe] - <i>Acinetobacter</i> sp
Spot 4	K.FVAEQFEGK.T	1054.52	2.85	0.2	Q1IE87 Q1IE87_PSEE4 Superoxide dismutase [Fe] - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 5	K.NALEPHISQETIEYHYGK.H	2129.03	4.84	0.2	A1S6W9 A1S6W9_SHEAM Superoxide dismutase - <i>Shewanella amazonensis</i>
Spot 5	K.NALEPHISQETIEYHYGK.H	2129.03	4.25	0.2	A1S6W9 A1S6W9_SHEAM Superoxide dismutase - <i>Shewanella amazonensis</i>
Spot 5	K.NALEPHISQETLEYHYGK.H	2129.03	4.84	0.5	A1U285 A1U285_MARAV Superoxide dismutase - <i>Marinobacter aquaeolei</i>
Spot 5	K.NALEPHISQETLEYHYGK.H	2129.03	4.25	0.4	A1U285 A1U285_MARAV Superoxide dismutase - <i>Marinobacter aquaeolei</i>
Spot 5	K.AQFTDSAVNNFGSAWTWLVK.K	2242.09	6.67	0.5	A3D3H6 A3D3H6_SHEB5 Superoxide dismutase - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 5	K.LNGLIEGTDFAGK.S	1334.70	4.63	0.4	A3D3H6 A3D3H6_SHEB5 Superoxide dismutase - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 5	K.AKFTDSAVNNFGSAWTWLVK.K	2242.13	6.67	0.2	Q083G8 Q083G8_SHEFN Superoxide dismutase - <i>Shewanella frigidimarina</i>
Spot 5	K.LNGLVEGTEFAGK.T	1334.70	3.01	0.4	Q083G8 Q083G8_SHEFN Superoxide dismutase - <i>Shewanella frigidimarina</i>
Spot 6	R.YYGGCEYVDVETLAIER.A	2136.00	6.52	0.3	A0KNH4 A0KNH4_AERHH Serine hydroxymethyltransferase - <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>
Spot 7	R.VAVTGAAGQIGYSLFR.I	1722.95	5.24	0.5	Q6F7X1 MDH_ACIAD Malate dehydrogenase - <i>Acinetobacter</i> SP
Spot 7	K.KFDVLVSSLSITDER.K	1756.91	5.93	0.2	Q88R52 Q88R52_PSEPK Amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding p - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 7	K.LYDTQENAYLDLVSGR.I	1856.90	5.36	0.4	Q88R52 Q88R52_PSEPK Amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding p - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 7	K.KFDFIVSSLSITDER.K	1756.91	5.93	0.2	Q1I3F2 Q1I3F2_PSEE4 Putative amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid- - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 7	R.M*GIEAAYPPFNNK.D	1467.69	4.53	0.3	Q1I3F2 Q1I3F2_PSEE4 Putative amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid- - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 7	K.QAVDFTDPYYSNK.Q	1547.70	4.11	0.4	Q1I3F2 Q1I3F2_PSEE4 Putative amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid- - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 8	R.EVFDYFLPEESR.D	1643.80	4.57	0.4	A3D204 A3D204_SHEB5 NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase. - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 8	R.FALEVVDAVVAR.I	1288.73	4.26	0.3	A3D204 A3D204_SHEB5 NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase. - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 8	R.VRDGVLPYSDM*LASLV	2108.06	4.16	0.5	A3D204 A3D204_SHEB5 NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase. - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 8	R.PFIANPDYVAR.V	1262.65	4.04	0.2	A3D204 A3D204_SHEB5 NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase. - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 8	K.PATLEDIQGLVR.D	1311.73	3.78	0.3	A3D204 A3D204_SHEB5 NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase. - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 8	R.FALEVVDAVVAR.I	1288.73	3.17	0.3	A3D204 A3D204_SHEB5 NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase. - <i>Shewanella baltica</i>
Spot 8	K.TPASYDYNVDVTR.K	1500.70	4.01	0.5	Q1LN75 Q1LN75_RALME Fructose-bisphosphate aldolase - <i>Ralstonia metallidurans</i>
Spot 9	R.YYGGCEYVDVETLAIER.A	2136.00	5.97	0.3	A0KNH4 A0KNH4_AERHH Serine hydroxymethyltransferase - <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>
Spot 9	R.VM*EAQGSQLTNK.Y	1321.64	3.94	0.1	A0KNH4 A0KNH4_AERHH Serine hydroxymethyltransferase - <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>
Spot 9	R.GGVILSAADDEDLYKK.L	1693.86	5.26	0.4	A3D7D0 A3D7D0_SHEB5 Serine hydroxymethyltransferase - <i>Shewanella baltica</i>

Spot	Peptídeo	MH+	Xc	ΔCn	Proteína
Spot 9	K.EADAALGSANITVNK.N	1473.75	4.87	0.4	A3D7D0 A3D7D0_SHEB5 Serine hydroxymethyltransferase - Shewanella baltica
Spot 9	R.GGVILSAADDEDLYK.K	1565.77	3.63	0.3	A3D7D0 A3D7D0_SHEB5 Serine hydroxymethyltransferase - Shewanella baltica
Spot 9	K.VYQQQVVNNAK.A	1290.68	3.47	0.2	A3D7D0 A3D7D0_SHEB5 Serine hydroxymethyltransferase - Shewanella baltica
Spot 9	K.IVSGGTSNHLMLVLDLIGR.D	1898.02	3.31	0.5	A3D7D0 A3D7D0_SHEB5 Serine hydroxymethyltransferase - Shewanella baltica
Spot 9	K.GQVLALCAR.F	987.54	3.13	0.2	A3D7D0 A3D7D0_SHEB5 Serine hydroxymethyltransferase - Shewanella baltica

MH+=valores de dipeptídeos; **Xc**= correlação cruzada; **ΔCn**= Correlação normalizada.

Apêndice 13

Tabela 10. Identificação de proteínas extraídas do solo contaminado por hidrocarbonetos (S3).

Spot	Peptídeo	MH+	Xc	ΔCn	Proteína
Spot 1	R.YEDVNVDDPNSSSGNQDR.Q	2010.83	7.11	0.6	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas putida
Spot 1	R.NAVVSLFTSDFGNGYTGSR.G	2106.97	6.64	0.4	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas putida
Spot 1	K.TDLSQLPNSNADVDTLQVDLEAK.F	2486.23	6.42	0.5	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas putida
Spot 1	K.TDLSQLPNSNADVDTLQVDLEAKF	2633.29	6.22	0.5	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas putida
Spot 1	K.ADLGGAIEVFASAGQYTLK.D	1797.90	6.20	0.5	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas putida
Spot 1	K.VGYEIDKNFSLGAAYLM*AK.T	2106.06	6.04	0.5	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas putida
Spot 1	K.NTDSTDGEDQAWLAGLK.T	1820.83	6.03	0.4	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas putida
Spot 1	R.RSTNQSFNDYFDKK.S	1749.82	4.54	0.4	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas putida
Spot 1	K.LTVGASIIYGYDNDK.E	1515.73	4.49	0.5	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas putida
Spot 1	K.HDAQVYHGQLGAK.F	1423.71	4.30	0.3	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas putida
Spot 1	R.STNQSFNDYFDKK.S	1593.72	4.18	0.2	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas putida
Spot 1	K.HDAQVYHGQLGAK.F	1423.71	3.97	0.4	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas putida
Spot 1	R.STNQSFNDYFDK.K	1465.62	3.90	0.3	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas putida
Spot 1	K.NFSLGAAYLMAK.T	1285.66	3.03	0.2	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas putida
Spot 1	K.MGAWSLDYNYR.D	1375.61	3.00	0.2	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas putida
Spot 1	K.DNVGDGVQYK.H	1209.54	2.63	0.5	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas putida
Spot 1	R.NAVVSLFTSDFGNGFTGSR.G	2090.98	7.04	0.6	Q116R2 Q116R2_PSEE4 Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas entomophila
Spot 1	R.ANGSINQAQYNELQGDLAK.E	2033.99	5.48	0.4	Q116R2 Q116R2_PSEE4 Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas entomophila

Spot	Peptídeo	MH+	Xc	ΔCn	Proteína
Spot 1	R.VGFYSEINPQVDAGVR.V	1750.88	5.34	0.5	Q1I6R2 Q1I6R2_PSEE4 Putative uncharacterized protein. - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 2	K.TVDFAASDSAM*SEADIAK.V	1844.82	6.41	0.5	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 2	K.NTAGVTVDYQSK.G	1282.63	3.74	0.4	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 2	R.DVYSNIFLGK.I	1155.60	3.14	0.3	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 2	K.HLSAINADFK.Q	1115.58	2.88	0.3	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 2	R.DLLSTYDFPGDDTPIIGSAR.M	2266.12	5.74	0.3	Q48D34 Q48D34_PSE14 Translation elongation factor Tu. - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
Spot 2	R.KLVETLDSYIPEPVR.L	1758.96	4.84	0.4	Q48D34 Q48D34_PSE14 Translation elongation factor Tu. - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
Spot 2	R.GITINTAHVEYNLSLR.H	1788.92	4.73	0.1	Q48D34 Q48D34_PSE14 Translation elongation factor Tu. - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
Spot 2	K.LVETLDSYIPEPVR.L	1630.87	4.02	0.4	Q48D34 Q48D34_PSE14 Translation elongation factor Tu. - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
Spot 2	K.VQDPLEIVGLR.D	1238.71	3.70	0.2	Q48D34 Q48D34_PSE14 Translation elongation factor Tu. - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
Spot 2	K.ADLVDDAELLELVEM*EVR.D	2075.02	6.28	0.4	Q7M7F1 Q7M7F1_CHRVO Translation elongation factor Tu - <i>Chromobacterium violaceum</i>
Spot 2	R.M*ALEGKDDNEMGTTAVK.K	1825.83	5.25	0.4	Q1IFW8 Q1IFW8_PSEE4 Protein chain elongation factor - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 2	R.VCSEVFGSAVVEFDK.I	1672.79	4.77	0.5	Q1IFW8 Q1IFW8_PSEE4 Protein chain elongation factor - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 2	R.M*ALEGKDDNEM*GTTAVK.K	1841.83	4.39	0.5	Q1IFW8 Q1IFW8_PSEE4 Protein chain elongation factor - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 2	R.GQVLVKPGSVKPHTK.F	1574.94	4.33	0.0	Q1IFW8 Q1IFW8_PSEE4 Protein chain elongation factor - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 2	R.DTTTTCTCTGVEMFR.K	1619.70	4.26	0.5	Q1IFW8 Q1IFW8_PSEE4 Protein chain elongation factor - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 2	R.AIDKPFLM*PIEDVFSISGR.G	2151.12	5.62	0.0	Q83ES6 Q83ES6_COXBU Translation elongation factor Tu. - <i>Coxiella burnetii</i>
Spot 2	R.AIDKPFLMPIEDVFSISGR.G	2135.12	5.05	0.0	Q83ES6 Q83ES6_COXBU Translation elongation factor Tu. - <i>Coxiella burnetii</i>
Spot 2	R.AIDQPFLM*PIEDVFSISGR.G	2151.08	5.62	0.3	Q1R0H7 Q1R0H7_CHRSD Translation elongation factor 1A - <i>Chromohalobacter salexigens</i>
Spot 2	R.AIDQPFLMPIEDVFSISGR.G	2135.08	5.05	0.4	Q1R0H7 Q1R0H7_CHRSD Translation elongation factor 1A - <i>Chromohalobacter salexigens</i>
Spot 2	R.VCSEVFGSAIVEFDK.I	1686.80	5.78	0.5	Q88QP8 EFTU1_PSEPK Elongation factor Tu-A - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 2	R.GITINTAHVEYNSTIR.H	1788.92	5.13	0.1	Q88QP8 EFTU1_PSEPK Elongation factor Tu-A - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 2	R.QVGVPYIVVFLNK.C	1475.86	3.90	0.1	Q6FDS5 Q6FDS5_ACIAD Protein chain elongation factor EF-Tu - <i>Acinetobacter</i> sp
Spot 2	R.AGENCGVLLR.G	1088.55	3.52	0.2	Q6FDS5 Q6FDS5_ACIAD Protein chain elongation factor EF-Tu - <i>Acinetobacter</i> sp
Spot 2	R.QVGVPYLVVFLNK.C	1475.86	3.90	0.0	Q9Z9L6 EFTU_BACHD Elongation factor Tu - <i>Bacillus halodurans</i>
Spot 2	R.GITINTAHVEYDSNVR.H	1788.89	4.49	0.2	A4VHL6 A4VHL6_PSEU5 Translation elongation factor Tu. - <i>Pseudomonas stutzeri</i>
Spot 2	R.HYAHVDCPGHADYVK.N	1768.79	4.90	0.5	A1TJ05 A1TJ05_ACIAC Translation elongation factor Tu - <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>

Spot	Peptídeo	MH+	Xc	ΔCn	Proteína
Spot 2	R.GITINTAHVEYETANR.H	1788.89	4.26	0.2	A1TJ05 A1TJ05_ACIAC Translation elongation factor Tu - <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>
Spot 3	R.NAVVSLFTDSDFGNGYTGSR.G	2106.97	6.38	0.6	Q88EC2 Q88EC2_PSEPK Putative uncharacterized protein. - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 3	R.GVDVLEM*HNLLTDIVQNK.E	2054.06	5.72	0.3	Q88P52 ARCA_PSEPK Arginine deiminase - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 3	K.ITPDTVGVLGTNEVR.S	1570.84	4.87	0.4	Q88P52 ARCA_PSEPK Arginine deiminase - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 3	R.KITPDTVGVLGTNEVR.S	1698.94	4.82	0.5	Q88P52 ARCA_PSEPK Arginine deiminase - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 3	R.KAGIEVITISAGELGR.G	1613.92	5.49	0.4	Q115H4 Q115H4_PSEE4 Arginine deiminase - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 3	R.LTPSNCDELLFDDVIWVDQAK.R	2478.19	5.08	0.3	Q115H4 Q115H4_PSEE4 Arginine deiminase - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 3	R.QAIGQLAQNLFQK.G	1401.78	4.30	0.4	Q115H4 Q115H4_PSEE4 Arginine deiminase - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 3	R.AAM*HLDTVFSFCDR.D	1685.74	4.49	0.4	Q02EJ4 Q02EJ4_PSEAB Arginine deiminase. - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Spot 3	R.VVETGGNSFAAER.E	1336.65	3.90	0.5	Q02EJ4 Q02EJ4_PSEAB Arginine deiminase. - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Spot 3	R.DLVTVFPEVVK.E	1245.71	3.37	0.3	Q02EJ4 Q02EJ4_PSEAB Arginine deiminase. - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Spot 3	R.LTPSNCDELLFDDVIWVNDQAK.R	2477.20	3.32	0.4	Q02EJ4 Q02EJ4_PSEAB Arginine deiminase. - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Spot 3	R.SAMHLDTVFSFCDR.D	1685.74	4.49	0.0	A4VHD1 A4VHD1_PSEU5 Arginine deiminase. - <i>Pseudomonas stutzeri</i>
Spot 3	R.ASMHLDTVFSFCDR.D	1685.74	4.50	0.0	A3MJP2 A3MJP2_BURM7 Arginine deiminase - <i>Burkholderia mallei</i>
Spot 4	K.DNASADIGDVGAAGPIAVTK.G	1988.99	6.63	0.5	Q88M48 Q88M48_PSEPK ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 4	K.RFEVLIPSDGSGVISGYTTVINK.Y	2395.29	6.28	0.4	Q88M48 Q88M48_PSEPK ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 4	R.FEVLIPSDGSGVISGYTTVINK.Y	2239.19	6.10	0.5	Q88M48 Q88M48_PSEPK ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 4	K.FEAEKDNASADIGDVGAAGPIAVTK.G	2593.28	5.98	0.4	Q88M48 Q88M48_PSEPK ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 4	K.RFEVLIPSDGSGVISGYTTVINK.Y	2395.29	5.44	0.4	Q88M48 Q88M48_PSEPK ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 4	K.HSDTDMSSAQELAK.F	1519.67	5.13	0.0	Q88M48 Q88M48_PSEPK ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 4	K.HSDTDM*SSAQELAK.F	1535.66	5.08	0.0	Q88M48 Q88M48_PSEPK ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 4	R.FEVLIPSDGSGVISGYTTVINK.Y	2239.19	5.07	0.4	Q88M48 Q88M48_PSEPK ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 4	K.DLVKEEERPK.T	1242.67	2.90	0.2	Q88M48 Q88M48_PSEPK ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 4	K.VAIGDVGTAQAANGVLAIAIYK.G	2215.21	7.74	0.6	Q11DF0 Q11DF0_PSEE4 Putative ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 4	K.GEVEGVVWDFNGLSYR.D	1925.94	6.24	0.5	Q11DF0 Q11DF0_PSEE4 Putative ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 4	K.GDEKNIEPGLQLFTK.L	1688.89	5.33	0.5	Q11DF0 Q11DF0_PSEE4 Putative ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 4	R.LSLANPTIQTLEK.G	1427.81	4.41	0.0	Q11DF0 Q11DF0_PSEE4 Putative ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas entomophila</i>

Spot	Peptídeo	MH+	Xc	ΔCn	Proteína
Spot 4	K.RLSLANPTIQTLEK.G	1583.91	3.84	0.0	Q1IDF0 Q1IDF0_PSEE4 Putative ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 4	K.GDEKNIEPGLQLFTK.L	1688.89	3.25	0.4	Q1IDF0 Q1IDF0_PSEE4 Putative ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 4	K.LPADVQAK.L	841.48	2.29	0.1	Q1IDF0 Q1IDF0_PSEE4 Putative ABC transporter, periplasmic binding protein. - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 4	K.HSDTDMSSAQEIAK.F	1519.67	5.13	0.5	A0RPY3 A0RPY3_CAMFF ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein. - <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>
Spot 4	K.HSDTDM*SSAQEIAK.F	1535.66	5.08	0.5	A0RPY3 A0RPY3_CAMFF ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein. - <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>
Spot 4	R.LSLANPTIQTIEK.G	1427.81	4.41	0.4	Q48L83 Q48L83_PSE14 ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein. - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
Spot 4	K.RLSLANPTIQTIEK.G	1583.91	3.84	0.3	Q48L83 Q48L83_PSE14 ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein. - <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
Spot 4	R.EYIFSDAGQINLAK.G	1568.80	5.26	0.5	Q02Q81 Q02Q81_PSEAB Putative ABC transporter, periplasmic substrate-binding prot - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Spot 5	K.TVDFAASDSAMSEADIAK.V	1828.83	6.62	0.6	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 5	K.TVDFAASDSAM*SEADIAK.V	1844.82	6.54	0.5	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 5	K.GQTIADSMGYIPLPPSVVDQVR.K	2343.20	6.50	0.5	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 5	K.GQTIADSM*GYIPLPPSVVDQVR.K	2359.20	5.83	0.5	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 5	K.VGEGVQLLPM*TAGEIVLAYNLPGNPK.G	2696.43	5.53	0.4	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 5	K.ITQWNDPQIAAANPDLK.L	1894.97	5.79	0.3	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 5	K.SYPITSYTWMI*IFR.K	1680.81	4.78	0.4	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 5	K.SYPITSYTWMI*IFR.K	1664.81	4.76	0.5	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 5	R.LTGSGASFPAPIYLTWFK.D	1956.03	4.62	0.4	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 5	K.NTAGVTVDYQSK.G	1282.63	4.14	0.4	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 5	R.QTPGAIGYIEYGFAL.L	1614.82	3.99	0.5	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 5	K.GSGAGVQDFLNK.T	1192.60	3.81	0.3	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 5	K.VDFAM*LQNK.A	1081.53	3.65	0.2	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 5	K.LPATPITVVVR.A	1165.73	3.32	0.3	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>

Spot	Peptídeo	MH+	Xc	ΔCn	Proteína
Spot 5	K.GSGAGVQDFLNK.T	1192.60	3.08	0.3	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 5	K.HLSAINADFK.Q	1115.58	2.76	0.2	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 6	K.GPGATSQTLDLISVEGVK.Q	1886.97	6.02	0.4	Q1I3W0 Q1I3W0_PSEE4 Putative uncharacterized protein. - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 6	K.KFDFIVSSLSITDER.K	1756.91	6.12	0.2	Q1I3F2 Q1I3F2_PSEE4 Putative amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid- - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 6	K.FDFIVSSLSITDER.K	1628.82	5.28	0.3	Q1I3F2 Q1I3F2_PSEE4 Putative amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid- - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 6	R.M*GIEAAYPPFNK.D	1467.69	4.35	0.3	Q1I3F2 Q1I3F2_PSEE4 Putative amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid- - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 6	R.MGIEAAYPPFNK.D	1451.70	3.86	0.3	Q1I3F2 Q1I3F2_PSEE4 Putative amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid- - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 6	K.DIGDALCAK.M	962.46	2.37	0.3	Q1I3F2 Q1I3F2_PSEE4 Putative amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid- - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 6	K.KFDFLVSSLSITDER.K	1756.91	6.12	0.0	Q88R52 Q88R52_PSEPK Amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding p - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 6	K.LYDTQENAYLDLVSGR.I	1856.90	5.32	0.4	Q88R52 Q88R52_PSEPK Amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding p - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 6	K.FDFLVSSLSITDER.K	1628.82	5.28	0.0	Q88R52 Q88R52_PSEPK Amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding p - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 6	K.YVQYEWLK.S	1128.57	2.76	0.3	Q88R52 Q88R52_PSEPK Amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding p - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 6	K.DGSNFEFK.G	943.42	2.66	0.3	Q88R52 Q88R52_PSEPK Amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding p - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 6	K.DASGNVVGFDK.D	1108.53	3.92	0.4	Q3KJK1 Q3KJK1_PSEPF Extracellular solute-binding protein, family 3 - <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Spot 7	R.EIAYFFAAATEVTTR	1618.81	4.31	0.4	Q1IEI5 Q1IEI5_PSEE4 Nucleoside diphosphate kinase - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 7	K.TSVGTFGSGWGWLVK.K	1581.81	4.26	0.4	Q02H75 Q02H75_PSEAB Superoxide dismutase - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Spot 7	K.HHNTYVVNLNLPVGFTEFEKG.S	2382.18	3.69	0.3	A0KI41 A0KI41_AERHH Superoxide dismutase - <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>
Spot 8	K.DFDGNFSWDSAKPEASK.I	1900.83	5.23	0.5	Q88D47 Y4981_PSEPK UPF0312 protein PP_4981 - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 8	K.HIASADFLDVK.K	1215.64	4.46	0.4	Q88D47 Y4981_PSEPK UPF0312 protein PP_4981 - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 8	R.DKHIASADFLDVK.K	1458.76	3.52	0.3	Q88D47 Y4981_PSEPK UPF0312 protein PP_4981 - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 8	K.TVDFAASDSAM*SEADIAK.V	1844.82	5.93	0.5	Q88JJ3 Q88JJ3_PSEPK Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding pro - <i>Pseudomonas putida</i>
Spot 8	K.GPGATSQTLDLISVEGVK.Q	1886.97	6.25	0.4	Q1I3W0 Q1I3W0_PSEE4 Putative uncharacterized protein. - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 8	R.AGFNATTTNLNDFGIK.G	1796.92	6.04	0.4	Q1I3W0 Q1I3W0_PSEE4 Putative uncharacterized protein. - <i>Pseudomonas entomophila</i>
Spot 8	K.TADVTGDLTM*HGVTKPVTFK.A	2134.08	4.54	0.5	Q1I3W0 Q1I3W0_PSEE4 Putative uncharacterized protein. - <i>Pseudomonas entomophila</i>

Spot	Peptídeo	MH+	Xc	ΔCn	Proteína
Spot 8	K.TADVTGDLTM*HGVT.K.P	1561.75	4.07	0.4	Q1I3W0 Q1I3W0_PSEE4 Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas entomophila
Spot 8	K.IDKEGQHAFVDWK.I	1572.78	3.96	0.3	Q1I3W0 Q1I3W0_PSEE4 Putative uncharacterized protein. - Pseudomonas entomophila
Spot 9	R.ADFAESIDANAVHGSDSEAAAAAR.E	2275.02	6.32	0.5	Q1IEI5 Q1IEI5_PSEE4 Nucleoside diphosphate kinase - Pseudomonas entomophila
Spot 9	R.EIAYFFAAETEVTTR	1618.81	4.93	0.5	Q1IEI5 Q1IEI5_PSEE4 Nucleoside diphosphate kinase - Pseudomonas entomophila
Spot 9	K.ITTRFEEAGLKIVASK.I	1763.01	3.04	0.4	Q1IEI5 Q1IEI5_PSEE4 Nucleoside diphosphate kinase - Pseudomonas entomophila
Spot 9	R.TFSIIKPDPAVAK.N	1289.75	3.84	0.4	A0LBZ0 A0LBZ0_MAGSM Nucleoside diphosphate kinase - Magnetococcus sp

MH+=valores de dipeptídeos; **Xc**= correlação cruzada; **ΔCn**= Correlação normalizada.

Apêndice 14

Tabela 11. Identificação de proteínas extraídas do solo contaminado por defensivos agrícolas (S9).

Spot	Peptídeo	MH+	Xc	ΔCn	Proteína
Spot 1	K.CDLVDDEELLELVEM*EVR.E	2222.02	6.04	0.3	Q6FDS5 Q6FDS5_ACIAD Protein chain elongation factor EF-Tu - Acinetobacter sp
Spot 1	R.GITINTSHVEYDSPIR.H	1801.91	5.08	0.4	Q6FDS5 Q6FDS5_ACIAD Protein chain elongation factor EF-Tu - Acinetobacter sp
Spot 1	R.ELLSTYDFPGDDTPVIR.G	1937.95	4.94	0.4	Q6FDS5 Q6FDS5_ACIAD Protein chain elongation factor EF-Tu - Acinetobacter sp
Spot 1	K.AFLMPIEDVFSISGR.G	1681.86	4.70	0.5	Q6FDS5 Q6FDS5_ACIAD Protein chain elongation factor EF-Tu - Acinetobacter sp
Spot 1	K.AFLM*PIEDVFSISGR.G	1697.86	4.55	0.3	Q6FDS5 Q6FDS5_ACIAD Protein chain elongation factor EF-Tu - Acinetobacter sp
Spot 1	K.DYSQIDSAPEEK.A	1381.61	4.10	0.4	Q6FDS5 Q6FDS5_ACIAD Protein chain elongation factor EF-Tu - Acinetobacter sp
Spot 1	K.TTLTAAIATICA.K.T	1334.73	3.72	0.4	Q6FDS5 Q6FDS5_ACIAD Protein chain elongation factor EF-Tu - Acinetobacter sp
Spot 1	R.AGENCGVLLR.G	1088.55	3.69	0.2	Q6FDS5 Q6FDS5_ACIAD Protein chain elongation factor EF-Tu - Acinetobacter sp
Spot 1	K.FDAEVYVLSK.E	1170.60	3.07	0.2	Q6FDS5 Q6FDS5_ACIAD Protein chain elongation factor EF-Tu - Acinetobacter sp
Spot 1	R.HYAHVDCPGHADYVK.N	1768.79	4.75	0.4	A1TJ05 A1TJ05_ACIAC Translation elongation factor Tu - Acidovorax avenae subsp. citrulli
Spot 1	R.QVGVPYIIVFLNK.C	1489.88	3.69	0.3	A1TJ05 A1TJ05_ACIAC Translation elongation factor Tu - Acidovorax avenae subsp. citrulli
Spot 1	R.QVGVPYIIVFINK.C	1489.88	3.69	0.2	Q1LSY4 Q1LSY4_BAUCH Translation elongation factor Tu. - Baumannia cicadellinicola subsp. Homalod
Spot 1	K.VGEEVEIVGIKDTV.K.T	1614.89	5.02	0.4	A3M1F6 A3M1F6_ACIAT Protein chain elongation factor EF-Tu. - Acinetobacter baumannii
Spot 1	K.TTVTGVE.M*FR.K	1156.57	3.56	0.3	A3M1F6 A3M1F6_ACIAT Protein chain elongation factor EF-Tu. - Acinetobacter baumannii
Spot 1	K.TTVTGVE.M*FR.K.L	1284.66	3.32	0.2	A3M1F6 A3M1F6_ACIAT Protein chain elongation factor EF-Tu. - Acinetobacter baumannii

Spot	Peptídeo	MH+	Xc	ΔCn	Proteína
Spot 1	K.TTVTGVEMFR.K	1140.57	2.35	0.3	A3M1F6 A3M1F6_ACIBT Protein chain elongation factor EF-Tu. - Acinetobacter baumannii
Spot 1	K.VGEEVEIVGLKDTV.K	1614.89	5.02	0.2	A1JIH3 A1JIH3_YERE8 Elongation factor TU. - Yersinia enterocolitica serotype O:8 / b
Spot 2	K.VLVVGNPANTNAYIAM*K.S	1790.95	5.67	0.5	A1TP96 MDH_ACIAAC Malate dehydrogenase - Acidovorax avenae subsp. citrulli
Spot 2	K.VLVVGNPANTNAYIAMK.S	1774.95	5.47	0.4	A1TP96 MDH_ACIAAC Malate dehydrogenase - Acidovorax avenae subsp. citrulli
Spot 2	R.TIEGLYVAGAPESTGFAR.L	1935.98	5.45	0.5	Q0KAA6 Q0KAA6_RALEH Catechol 1,2-dioxygenase - Ralstonia eutropha
Spot 2	K.VNGEFIGQGQALNEVASR.D	2002.04	6.27	0.5	Q6F7X1 MDH_ACIAAD Malate dehydrogenase - Acinetobacter sp
Spot 2	R.VAVTGAAGQIGYSLLFR.I	1722.95	5.88	0.5	Q6F7X1 MDH_ACIAAD Malate dehydrogenase - Acinetobacter sp
Spot 2	K.DQPVLQLEIPVEK.A	1734.00	5.10	0.3	Q6F7X1 MDH_ACIAAD Malate dehydrogenase - Acinetobacter sp
Spot 2	R.GITINTSHVEYDSPIR.H	1801.91	4.81	0.3	Q6FDS5 Q6FDS5_ACIAAD Protein chain elongation factor EF-Tu - Acinetobacter sp
Spot 2	K.AFLM*PIEDVFSISGR.G	1697.86	4.50	0.2	Q6FDS5 Q6FDS5_ACIAAD Protein chain elongation factor EF-Tu - Acinetobacter sp
Spot 2	R.INFTLNELEER.A	1506.74	4.60	0.4	A3M928 MDH_ACIBT Malate dehydrogenase - Acinetobacter baumannii
Spot 3	K.VLVVGNPANTNAYIAMK.S	1774.95	5.23	0.4	A1TP96 MDH_ACIAAC Malate dehydrogenase - Acidovorax avenae subsp. citrulli
Spot 3	K.VLVVGNPANTNAYIAM*K.S	1790.95	5.09	0.6	A1TP96 MDH_ACIAAC Malate dehydrogenase - Acidovorax avenae subsp. citrulli
Spot 3	R.VAVTGAAGQIGYSLLFR.I	1722.95	5.87	0.5	Q6F7X1 MDH_ACIAAD Malate dehydrogenase - Acinetobacter sp
Spot 3	K.DQPVLQLEIPVEK.A	1734.00	4.69	0.3	Q6F7X1 MDH_ACIAAD Malate dehydrogenase - Acinetobacter sp
Spot 3	K.VAFKDADYALLVGSRRP.G	1878.02	3.78	0.4	Q6F7X1 MDH_ACIAAD Malate dehydrogenase - Acinetobacter sp
Spot 3	K.DADYALLVGSRRP.P	1179.60	3.19	0.3	Q6F7X1 MDH_ACIAAD Malate dehydrogenase - Acinetobacter sp
Spot 3	K.DADYALLVGSRRP.G	1432.75	2.73	0.2	Q6F7X1 MDH_ACIAAD Malate dehydrogenase - Acinetobacter sp
Spot 3	K.IVQGLEIDEFSR.E	1405.73	4.65	0.3	A3M928 MDH_ACIBT Malate dehydrogenase - Acinetobacter baumannii
Spot 3	R.INFTLNELEER.A	1506.74	4.49	0.4	A3M928 MDH_ACIBT Malate dehydrogenase - Acinetobacter baumannii
Spot 4	K.KAELSFAEEVAAAQAAAK	1804.94	7.33	0.5	A3M750 A3M750_ACIBT Protein chain elongation factor EF-Ts. - Acinetobacter baumannii
Spot 4	K.AELSFAEEVAAAQAAAK	1676.85	5.69	0.5	A3M750 A3M750_ACIBT Protein chain elongation factor EF-Ts. - Acinetobacter baumannii
Spot 4	K.ALESGKPANIVEK.M	1355.75	3.95	0.2	A3M750 A3M750_ACIBT Protein chain elongation factor EF-Ts. - Acinetobacter baumannii
Spot 4	K.ALTEANGDIELAIDNLR.K	1827.94	4.46	0.2	Q6FA54 EFTS_ACIAAD Elongation factor Ts - Acinetobacter sp
Spot 4	K.AIESGKPANIVEK.M	1355.75	3.95	0.4	Q6FA54 EFTS_ACIAAD Elongation factor Ts - Acinetobacter sp
Spot 4	K.KALTEANGDIELAIDNLR.K	1956.04	3.70	0.2	Q6FA54 EFTS_ACIAAD Elongation factor Ts - Acinetobacter sp
Spot 4	K.ALTEANGDIELAIDNLR.K	1827.94	3.63	0.3	Q6FA54 EFTS_ACIAAD Elongation factor Ts - Acinetobacter sp
Spot 4	K.AILIEVNCQTDFAK.N	1720.89	5.26	0.5	Q9PPX5 EFTS_UREPA Elongation factor Ts - Ureaplasma parvum
Spot 4	K.DFLIDPYNVVEAR.A	1550.78	4.16	0.2	P00911 TRPC_ACIAAD Indole-3-glycerol phosphate synthase - Acinetobacter sp
Spot 4	R.SKRPGVIAEIK.K	1197.73	3.36	0.2	P00911 TRPC_ACIAAD Indole-3-glycerol phosphate synthase - Acinetobacter sp
Spot 5	K.YISTFLESLVNWYANAK.L	2134.05	6.19	0.6	Q6FCJ6 Q6FCJ6_ACIAAD Superoxide dismutase [Fe] - Acinetobacter sp

Spot	Peptídeo	MH+	Xc	ΔCn	Proteína
Spot 5	K.HHQTYYVTNLNNLIK.G	1694.90	4.06	0.3	Q6FCJ6 Q6FCJ6_ACIAD Superoxide dismutase [Fe] - Acinetobacter sp
Spot 6	R.TQAPHSASAQFFINVK.N	1745.90	5.61	0.4	Q6FB14 Q6FB14_ACIAD Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase - Acinetobacter sp
Spot 6	R.DGFYDGVIFHR.V	1325.63	3.54	0.3	Q6FB14 Q6FB14_ACIAD Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase - Acinetobacter sp
Spot 6	R.VIDGFM*IQGGGM*DENFKEK.A	2146.98	2.98	0.2	Q6FB14 Q6FB14_ACIAD Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase - Acinetobacter sp
Spot 6	K.TVANFLEYVR.D	1211.64	2.93	0.2	Q6FB14 Q6FB14_ACIAD Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase - Acinetobacter sp
Spot 6	R.VIDGFM*IQGGGFDKDM*KEK.A	2147.01	2.94	0.2	A6SZV2 A6SZV2_JANMA Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B - Janthinobacterium sp
Spot 6	-.M*SPEQVIDTIK.N	1276.65	2.29	0.2	A1B209 A1B209_PARDP DNA polymerase, beta-like. - Paracoccus denitrificans
Spot 6	K.VVEGMETIDKIK.S	1361.73	4.07	0.2	Q0KCB1 Q0KCB1_RALEH Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, cyclophilin family - Ralstonia eutropha
Spot 6	-.M*IQGGGFDENFK.E	1358.60	3.97	0.3	A3M6J2 A3M6J2_ACIBT Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase - Acinetobacter baumannii
Spot 7	K.AVVVYFSGYGHTK.R	1427.73	4.20	0.5	Q02Q31 Q02Q31_PSEAB Putative flavodoxin. - Pseudomonas aeruginosa
Spot 7	K.IQIVEINAGGIGR.D	1339.77	4.85	0.4	Q6FAK2 Q6FAK2_ACIAD Alkyl hydroperoxide reductase, C22 subunit, thioredoxin-like - Acinetobacter sp
Spot 7	K.NFEVLIEAEGADR.G	1575.80	5.37	0.3	Q6FEY2 Q6FEY2_ACIAD Alkyl hydroperoxide reductase, C22 subunit, thioredoxin-like - Acinetobacter sp
Spot 7	K.LGVEIYSVSTDTHFTHK.A	1933.97	4.84	0.3	A0KJ17 A0KJ17_AERHH Alkyl hydroperoxide reductase subunit C - Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila
Spot 8	K.HLSQAEAEFGFYAEHK.E	1716.80	5.91	0.5	Q6FEM7 NDK_ACIAD Nucleoside diphosphate kinase - Acinetobacter sp
Spot 8	R.VAVTGAAGQIGYSLLFR.I	1722.95	5.76	0.5	Q6F7X1 MDH_ACIAD Malate dehydrogenase - Acinetobacter sp
Spot 8	K.DQPVLQLEIPVEK.A	1734.00	3.57	0.2	Q6F7X1 MDH_ACIAD Malate dehydrogenase - Acinetobacter sp
Spot 8	R.INFTLNELEEER.A	1506.74	3.67	0.3	A3M928 MDH_ACIBT Malate dehydrogenase - Acinetobacter baumannii
Spot 8	K.IVQGLEIDEFSR.E	1405.73	3.71	0.3	A3M928 MDH_ACIBT Malate dehydrogenase - Acinetobacter baumannii
Spot 8	R.TLSIVKPDAAVAK.N	1241.75	1.74	0.2	Q7NS84 NDK_CHRVO Nucleoside diphosphate kinase - Chromobacterium violaceum
Spot 9	R.DGQRVEFSVVQGQK.G	1576.81	3.83	0.2	Q6FCM6 Q6FCM6_ACIAD Putative cold shock protein. - Acinetobacter sp
Spot 9	R.VEFSVVQGQK.G	1120.60	2.77	0.2	Q6FCM6 Q6FCM6_ACIAD Putative cold shock protein. - Acinetobacter sp

MH+=valores de dipeptídeos; **XC**= correlação cruzada; **ΔCn**= Correlação normalizada.

6. CONCLUSÕES FINAIS

- O emprego de ferramentas analíticas baseadas em atividades microbianas do solo pode ser seriamente comprometida pela presença dos metais cromo e cobre, podendo subestimar o nível de poluição do ambiente contaminado;

- A metaproteômica aplicada a ambientes contaminados certamente contribuirá no desenvolvimento de novas tecnologias para a biorremediação de ambientes impactados e poderá servir na "ligação" das informações geradas pela metagenômica e sua verdadeira função fisiológica no ambiente;

- No futuro próximo, há que se trabalhar muito ainda para buscar um padrão de análise de imagens que possa ser empregada na análise de distintos solos, contudo, esta ferramenta abre uma nova perspectiva para os estudos de ecologia microbiana e microbiologia ambiental aplicada.